



**ESTUDO POR MICROTOMOGRAFIA DE RAIOS X DA REGENERAÇÃO
EM DEFEITO DE TÍBIA DE RATOS IMPLANTADOS COM NANOPARTÍCULAS
DE HIDROXIAPATITA PURAS E DOPADAS**

Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Engenharia Nuclear, COPPE,
da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como
parte dos requisitos necessários à obtenção do
título de Doutor em Engenharia Nuclear.

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes
Davi Ferreira de Oliveira
Alexandre Malta Rossi

Rio de Janeiro
Dezembro de 2023

ESTUDO POR MICROTOMOGRAFIA DE RAIOS X DA REGENERAÇÃO EM
DEFEITO DE TÍBIA DE RATOS IMPLANTADOS COM NANOPARTÍCULAS DE
HIDROXIAPATITA PURAS E DOPADAS

Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Davi Ferreira de Oliveira

Alexandre Malta Rossi

Aprovada por: Prof. Ricardo Tadeu Lopes

Prof. Davi Ferreira de Oliveira

Prof. Alexandre Malta Rossi

Dra. Olga Maria Oliveira de Araújo

Prof^a. Célia Machado Ronconi

Prof. André Linhares Rossi

Prof. Marcos Farina de Souza

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

DEZEMBRO DE 2023

Dos Santos, Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias

Estudo por Microtomografia de Raios X da Regeneração em Defeito de Tíbia de Ratos Implantados com Nanopartículas de Hidroxiapatita Puras e Dopadas / Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2023.

IX, 91 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Davi Ferreira de Oliveira

Alexandre Malta Rossi

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Nuclear, 2023.

Referências Bibliográficas: p. 80-91.

1. Caracterização por imageamento. 2. Biomateriais. 3. Arquitetura trabecular. I. Lopes, Ricardo Tadeu *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha companheira Bianca, cujo companheirismo e compreensão ao longo destes anos foram incomensuráveis, tendo sido imprescindíveis tanto para meu desenvolvimento acadêmico quanto pessoal.

Agradeço à Rosalia, minha mãe, por todos os sacrifícios realizados pela minha formação pessoal e acadêmica, bem como seu apoio incondicional que segue até hoje. Aos familiares, tia Rose e Eduardo, pelas reuniões virtuais na pandemia e palavras de carinho. E aos meus parentes que já se foram, mas foram fundamentais na minha construção pessoal, os meus queridos avós Rosilda e Mazinho, e ao meu pai, Edvaldo dos Santos.

Aos amigos de longa data, Fernando, Luiz, Rafael Aragão, Pedro, Raphael, Nathália Selma e Victor Bender, Wellington e Camila, Guilherme Menegucci e Francisco, Alam e Tuane, André, Marcello e Vivian Maria, que colaboraram para a manutenção da minha saúde mental na pandemia nos encontros online, bem como pelas palavras de conforto, apoio e confiança depositadas em mim, além das alegrias e momentos divididos. Não tenho irmão/a de sangue, mas sei que tenho grandes irmãos/ãs em vida, muito obrigado amigos/as.

Aos amigos e colegas do LIN, por toda ajuda, atenção, paciência e ensinamentos a mim concedidos ao longo destes anos de convívio.

Às grandes professoras Alessandra e Olga, por todos os ensinamentos, e por serem sempre prestativas, atenciosas e dispostas a ajudar, desde a emprestar uma fita adesiva a revisar artigos, minha profunda gratidão.

À Soraia, pelas caronas que tornaram possível a realização de trabalhos nos períodos da pandemia em que era arriscadíssimo adentrar transportes coletivos. Soraia, como prometido, um parágrafo de agradecimento sincero a você, que nem aceitou uma ajuda com o pedágio!

Ao grande camarada professor Manoel Fernandez, cuja amizade (e as muitas caronas!) muito me engrandeceu nos últimos anos. Ao amigo Jhonathan Barros, da UFF, cujo interesse pela pesquisa me ajudou enormemente nos últimos meses. À Marina Espinoza, pela manutenção da minha saúde mental e compreensão ao longo dos anos. Ao prof. Sérgio dos Reis, por todas

as discussões sobre meu tema de pesquisa e sua incrível paciência em ensinar. Ao amigo Alessandro, pelas inestimáveis dicas desde que cheguei à COPPE.

Ao pessoal da Física da UERJ, especialmente ao prof. Marcelino e o pesquisador Ramon, por abrirem as portas de seu laboratório para mim, sempre dispostos a ensinar e colaborar.

Ao pessoal do Museu Nacional, ao grande amigo Carlos e o prof. Leandro, pela parceria estabelecida ao longo destes anos, das quais colaborações me engrandeceram imensamente.

Ao pessoal do CNPEM como um todo, que me receberam de braços abertos, me fazendo me sentir verdadeiramente em casa. Ao pessoal da SAU, Vilmara, Kerolyn e Renata, pela paciência inesgotável com este usuário, sei que muitas vezes devo ter testado seus limites e, ainda assim, nunca responderam com nada além de cordialidade e profissionalismo. Agradeço ao pessoal da linha Mogno, especialmente à profa. Nathaly, por permitir minha estadia lá, à Paola pela incrível paciência e didática, e principalmente ao Victor, cuja ajuda foi absolutamente fundamental para o desenvolvimento do trabalho desde o início.

Ao corpo técnico do CBPF responsável pelos servidores, Valeriana e Ailton, sempre muito profissionais, mas acima de tudo atenciosos, compreensivos e muito pacientes.

Aos colegas e professores da Rede Nano Saúde, com os quais aprendi imensamente ao longo dos últimos anos. Em especial, à Camilla pela camaradagem na pesquisa, que contribuiu fortemente para o desenvolvimento do meu conhecimento na área e do trabalho, e pelo empenho com as FIBs das amostras, bem como os professores Farina, André e Mônica, cujos encontros foram todas grandes oportunidades de aprendizado, é uma grande honra poder trabalhar convosco.

Finalmente, aos meus incríveis orientadores, profs. Ricardo, Davi e Alexandre. Faltariam palavras para descrever tudo o que aprendi com os senhores, bem como para agradecer por tudo que fizeram por mim ao longo dos últimos anos. Contudo, posso dizer tranquilamente que não seria metade do pesquisador que sou hoje sem a magnífica orientação que me concederam, que se estende do profissional ao pessoal, sou profundamente grato por ter tido a oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao CNPQ pelo fomento, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

**ESTUDO POR MICROTOMOGRAFIA DE RAIOS X DA REGENERAÇÃO EM
DEFEITO DE TÍBIA DE RATOS IMPLANTADOS COM NANOPARTÍCULAS DE
HIDROXIAPATITA PURAS E DOPADAS**

Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos

Dezembro/2023

Orientadores: Ricardo Tadeu Lopes

Davi Ferreira de Oliveira

Alexandre Malta Rossi

Programa: Engenharia Nuclear

A confecção de materiais que estimulem a regeneração óssea requer entender como suas propriedades se relacionam com o osso neoformado. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar como a fragmentação de biomateriais nanoestruturados afeta a arquitetura, topologia e osteocondutividade do osso neoformado em um defeito não crítico de tibia de rato, no período de 21 dias após a implantação. Os materiais estudados são constituídos por microesferas de alginato contendo nanopartículas de hidroxiapatita (HA), hidroxiapatita carbonatada (CHA) e CHA dopada com estrôncio (SrCHA). Foram utilizadas as técnicas de SR-microCT e FIB-SEM para caracterizar a fragmentação das microesferas e o osso neoformado. Os resultados da HA e CHA demonstraram que a capacidade dos biomateriais estimularem a formação óssea foi fortemente impactada por como a fragmentação das esferas se deu nestas amostras, onde a forma, volume e superfície de fragmentos não fomentaram o crescimento ósseo. Na SrCHA, a fragmentação das esferas resultou em partículas pequenas ($< 50 \mu\text{m}$), que foram incorporadas às trabéculas neoformadas, e houve uma integração completa de fragmentos de material e matriz óssea, com atividade celular na interface entre eles. A arquitetura trabecular (abundância e distribuições angulares dos nodos 3N, 4N e 5N) manteve o princípio da tenségridade, como na literatura, porém com diferença na planaridade dos nodos 3N, indicando o potencial deste sistema para o melhor entendimento da organização hierárquica do osso como um todo. A metodologia de análise por esqueletização desenvolvida pode ser aplicada a sistemas similares, bem como de quaisquer amostras cujas estruturas podem ser aproximadas a de uma rede constituída por nodos e segmentos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

**X-RAY MICROTOMOGRAPHY STUDY OF THE REGENERATION OF RAT TIBIA
DEFECTS IMPLANTED WITH PURE AND DOPATED HYDROXYAPATITE
NANOPARTICLES**

Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos

December/2023

Advisors: Ricardo Tadeu Lopes

Davi Ferreira de Oliveira

Alexandre Malta Rossi

Department: Nuclear Engineering

The fabrication of materials that promote bone regeneration requires understanding how their properties relate to the newly formed bone. The objective of this study was to assess how the fragmentation of nanostructured biomaterials affects the architecture, topology, and osteoconductivity of newly formed bone in a non-critical defect in rat tibia over a period of 21 days post-implantation. The studied materials consist of alginate microspheres containing hydroxyapatite (HA), carbonate hydroxyapatite (CHA), and strontium-doped CHA (SrCHA) nanoparticles. SR-microCT and FIB-SEM techniques were used to characterize the fragmentation of microspheres and newly formed bone. Results for HA and CHA showed that the ability of biomaterials to stimulate bone formation was strongly influenced by how sphere fragmentation occurred in these samples, where the shape, volume, and surface of fragments did not support bone growth. In SrCHA, sphere fragmentation resulted in small particles ($<50 \mu\text{m}$), which were incorporated into the newly formed trabecular network, leading to complete integration of material fragments and bone matrix, with cellular activity at the interface between them. Trabecular architecture (abundance and angular distributions of 3N, 4N, and 5N nodes) maintained the principle of tensegrity, as reported in the literature, but with differences in the planarity of 3N nodes, indicating the potential of this system for a better understanding of the hierarchical organization of bone. The developed skeletonization analysis methodology can be applied to similar systems and any samples whose structures can be approximated to a network consisting of nodes and segments.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
3. Fundamentação Teórica.....	10
3.1. Tecido ósseo.....	10
3.1.1. Estrutura óssea na microescala.....	12
3.1.2. Regeneração óssea.....	12
3.2. Biomateriais e seus mecanismos biológicos de atuação.....	13
3.3. Classificação dos Biomateriais.....	14
3.4. A hidroxiapatita e hidroxiapatitas substituídas.....	16
3.5. Princípios gerais da tensegridade.....	19
3.6. Microtomografia Computadorizada por Raios X (MicroCT)	20
3.6.1. Breve histórico.....	21
3.6.2. Princípios gerais da MicroCT.....	23
3.6.2.1. Princípios físicos.....	24
3.6.3. A fonte de raios X.....	27
3.6.4. Reconstrução.....	29
3.6.5. A imagem digital.....	32
4. Materiais e Métodos.....	35
4.1. Biomateriais.....	35
4.1.1. Síntese dos pós de HA, CHA e SrCHA.....	35
4.1.2. Confecção dos biomateriais.....	35

4.1.3. Modelo <i>in vivo</i>	36
4.2. Técnicas experimentais.....	37
4.2.1. MicroCT.....	37
4.2.1.1. SR-microCT.....	38
4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura de duplo feixe (FIB-SEM).....	38
4.3. Processamento.....	38
4.3.1. SR-microCT.....	39
4.4. Análises.....	45
4.4.1. Arquitetura Trabecular.....	46
4.4.2. Parâmetros morfométricos.....	51
5. Resultados e Discussões.....	53
5.1. SR-microCT.....	53
5.1.1. HA.....	53
5.1.2. CHA.....	58
5.1.3. SrCHA.....	61
5.2. FIB-SEM.....	72
6. Conclusões.....	77
7. Referências Bibliográficas.....	80

1. Introdução

O osso é um material extremamente dinâmico e complexo, presente em todos os vertebrados. Responsável tanto pela proteção dos órgãos como sustentação de músculos, também consiste em um rico reservatório de minerais fundamentais para o bom funcionamento do organismo, principalmente o cálcio e o fósforo. O osso é composto por uma parte orgânica – basicamente colágeno –, e uma parte inorgânica, composta predominantemente por cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (LEFEBVRE *et al.*, 2010; ROSS e PAWLINA, 2016; REZNIKOV *et al.*, 2014).

Dada sua grande importância para a manutenção do organismo, em caso de lesão óssea é imprescindível que sua recuperação seja dada o mais rápido possível. Nesse sentido, se faz de suma importância o estudo de materiais capazes de estimular o processo de regeneração óssea enquanto mantém as propriedades mecânicas e estruturais do osso recém-formado durante o processo de regeneração. Este é um campo da ciência de materiais que vem crescendo nas últimas décadas (ZHOU *et al.*, 2021). Dentre os diferentes tipos de materiais, os materiais nanoestruturados compostos de hidroxiapatita carbonatada e o polímero alginato se destacam (TAN *et al.*, 2013; SHEIKH *et al.*, 2015; YI *et al.*, 2016). Existem vantagens no uso destes biomateriais, dentre as quais se destacam sua alta biocompatibilidade, porosidade, biodegradação e capacidade de reproduzir a estrutura e composição do osso na escala nanométrica (WANG *et al.*, 2014, LYONS *et al.*, 2020).

A concepção de um biomaterial eficiente passa pela consideração de diversas variáveis, como sua cristalinidade, forma, composição química, capacidade de osteocondução, bioatividade e fragmentação *in vivo* (HUTMACHER *et al.*, 2007; HENKEL *et al.*, 2013). A fragmentação do biomaterial nanoestruturado está associada à capacidade de dispersão e degradação de suas partes durante o reparo ósseo, enquanto o osso novo cresce e toma seu lugar. Apesar do uso de uma grande quantidade de biomateriais degradáveis em pesquisas nas áreas de biomedicina e bioengenharia, não há até o momento informação do impacto que a fragmentação do biomaterial tem na arquitetura do osso neoformado (WEI *et al.*, 2020).

A microtomografia computadorizada por luz síncrotron (SR-microCT) representa o estado da arte em imageamento por raios X. Contando com um intenso feixe e alta resolução em energia, a técnica permite a reconstrução digital de amostras com tamanhos de pixel da ordem de um micrômetro ou menor (PAIVA *et al.*, 2022), sendo, portanto, ferramenta amplamente empregada na caracterização de amostras ósseas contendo biomateriais (FERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Contudo, o estudo de biomateriais nanoestruturados requer, também, a investigação na escala nanométrica, o que é possibilitado por técnicas de imageamento como a microscopia eletrônica de varredura por feixe de íons focalizado (FIB-SEM, LI *et al.*, 2018), permitindo analisar a interface entre o biomaterial e o osso neoformado com imagens de pixel da ordem de nanômetros.

Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito da fragmentação de biomateriais nanoestruturados na arquitetura do osso trabecular, em formação, durante um processo de reparo ósseo. Os materiais estudados são constituídos por microesferas de alginato contendo nanopartículas de hidroxiapatita (HA), hidroxiapatita dopada com íons carbonato (CHA) e a CHA dopada com estrôncio (SrCHA). As microesferas foram implantadas em um defeito não crítico de tibia, e analisadas 21 dias após a implantação por técnicas de imageamento que permitem analisar as estruturas ósseas formadas na escala micrométrica (SR-microCT) e nanométrica (FIB-SEM).

Os objetivos específicos do trabalho estão listados a seguir:

- Desenvolvimento de uma metodologia de segmentação usando o novo software do CNPEM – Annotat3D em amostras ósseas.
- Caracterização da fragmentação do biomaterial após a implantação quanto a distribuição do volume e diâmetro equivalente dos fragmentos do biomaterial, bem como o volume relativo ocupado na região do defeito.
- Caracterização morfométrica do osso neoformado, com a análise de parâmetros característicos (espessura trabecular, volume relativo ocupado no defeito, e comprimento das trabéculas).

- Avaliar a influência do biomaterial na arquitetura do osso trabecular formado na região do defeito, através da esqueletização da amostra contendo SrCHA para a quantificação da distribuição dos ângulos entre trabéculas e dos nódulos 3N, 4N, 5N.
- Estudo da interface entre osso e biomaterial na nano escala da amostra de SrCHA, através da segmentação das fases das imagens adquiridas por FIB-SEM (osso novo, célula, biomaterial), quantificando as frações de osso novo e biomaterial ocupado nos volumes analisados.

2. Revisão Bibliográfica

Fosfatos de cálcio têm sido estudados e utilizados na confecção de biomateriais para a regeneração óssea há mais de 80 anos, especialmente a hidroxiapatita, geralmente na forma cerâmica, de estrutura cristalina (CARMO *et al.*, 2017). Apesar de constituírem materiais bioativos e osteocondutores, sua capacidade de fragmentação no organismo é baixa, limitando a regeneração óssea. Neste sentido, o desenvolvimento de biomateriais à base de fosfatos de cálcio, mas com maior capacidade de biodegradação, se faz necessário. Assim, trabalhos têm sido realizados ao longo das últimas décadas no sentido de estudar biomateriais feitos a partir de mistura de fosfatos de cálcio ao alginato, um biopolímero altamente solúvel no organismo (CALASANS-MAIA, *et al.*, 2015, MACHADO *et al.*, 2016, CARMO *et al.*, 2017), tais quais são os utilizados neste trabalho.

(CALASANS-MAIA *et al.*, 2015) investigaram as respostas biológicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* de biomateriais compostos por microesferas do polímero alginato contendo hidroxiapatita carbonatada (CHA) nanoestruturada, usando como base de comparação um biomaterial à base de hidroxiapatita sinterizada (HA), analisados em tempos experimentais de 7, 21 e 42 dias após implantação. As análises histomorfométricas indicaram maior formação óssea nas amostras de CHA, nos tempos de 21 e 42 dias, bem como maior absorção, quando comparado à HA. Verificaram também a osteocondutividade da CHA, e um aumento dos níveis de proteínas associadas à reabsorção, indicando que a CHA de fato sofreu bioabsorção mais rapidamente que a HA.

A utilização de fosfatos de cálcio como agentes de entrega de medicamentos é vasta, e muito bem documentada (Uskokovic e Uskokovic, 2010, LARA-OCHOA *et al.*, 2021), especialmente nas formas de HA cerâmica. A capacidade de atuação das microesferas de CHA desenvolvidas pelo grupo de pesquisa como dispositivos biomiméticos de entrega controlada de medicamentos foi avaliada por (CALASANS-MAIA *et al.*, 2019), que observaram não só o caráter antibactericida do biomaterial carregado com minociclina exposto à bactéria *Enterococcus faecalis* durante o reparo ósseo de alvéolos dentários em ratos, mas também a citocompatibilidade e osteocondução do biomaterial neste sistema.

A estrutura da hidroxiapatita compreende uma variedade de substituições, que visam otimizar as propriedades do biomaterial resultante relativas à regeneração óssea, como a capacidade de fragmentação das microesferas e a osteocondução. Dentre elas estão as substituições catiônicas por metais, como o Sr (VALIENSE *et al.*, 2015, KAMMER *et al.*, 2016, CARMO *et al.*, 2017).

O comportamento tanto *in vivo* quanto *in vitro* do biomaterial composto pelo alginato nanoestruturado de hidroxiapatita carbonatada contendo estrôncio (SrCHA) foi estudado por (VALIENSE *et al.*, 2015). Seu modelo consistiu em biomateriais no formato de microesferas de diâmetro entre 425 e 600 μm , implantadas em mandíbulas de coelhos, com tempos experimentais de 4 e 12 semanas. Realizaram análises histológicas e histomorfométricas e avaliaram a citotoxicidade dos materiais. Utilizando a hidroxiapatita carbonatada (CHA) como referência, mostraram que ambos os materiais são citocompatíveis e biocompatíveis. Apesar de terem observado formação óssea em ambos os casos, após 12 semanas havia menor quantidade de biomaterial no caso das amostras contendo SrCHA do que das contendo CHA, mostrando que as amostras de SrCHA se fragmentam mais do que as CHA. Mostraram que, após 4 semanas de implantação, enquanto as microesferas de CHA ainda possuíam uma forma bem definida, SrCHA tinha uma forma mais difusa e fragmentada, indicando que este material teve maior permeabilidade do que o CHA, e que os íons de Sr^{2+} foram incorporados na estrutura molecular do composto examinado. Além disso, observaram que a SrCHA também promoveu osteocondução.

(KAMMER *et al.*, 2016) avaliaram a biocompatibilidade do biomaterial composto por microesferas de SrCHA (5 wt%), comparada à biocompatibilidade da hidroxiapatita carbonatada, CHA, ambos sintetizados à 37 °C. Para a caracterização, usaram as técnicas de difração de raios X, espectroscopia vibracional em transformada de Fourier no infravermelho, microscopia eletrônica e análise histológica. Foram utilizados 45 animais no total, sendo 15 para cada grupo experimental com implante de biomaterial (SrCHA, CHA e HA), e grupo controle sem implantação. Os tempos experimentais avaliados foram os de 1, 3 e 9 semanas após implantação subcutânea nos ratos. Dentre seus resultados, foi verificada a biocompatibilidade dos materiais, tendo sido observado que os grupos implantados com CHA e SrCHA apresentaram bioabsorção mais rápida em comparação ao grupo controle. Analogamente, (CARMO *et al.*, 2017) analisaram os biomateriais de microesferas contendo

CHA e SrCHA, mas sintetizadas à 5 °C, e tempos experimentais de 1 e 6 semanas após implante em alvéolos de ratos, observando também que os biomateriais se mostraram biocompatíveis, osteocondutores e bioabsorvíveis nos sistemas avaliados. Também, (MACHADO *et al.*, 2016) observaram propriedades de biocompatibilidade e osteocondução do biomaterial à base de nanopartículas de HA contendo estrôncio (1%), a SrHA, sintetizadas em altas temperaturas (material cerâmico) em um modelo de tibia de ovelhas.

A temperatura na qual os biomateriais são sintetizados afeta diretamente a cristalinidade e bioabsorção da hidroxiapatita presente nos mesmos. Assim, estudos foram realizados visando avaliar como a cristalinidade das nanopartículas de hidroxiapatita pode afetar o crescimento ósseo, em nível celular (MAVROPOULOS *et al.*, 2011). Para tal, analisaram alterações de pH, citotoxicidade, e concentração do íon Ca^{2+} dos biomateriais compostos por hidroxiapatita carbonatada (CHA) confeccionados a diferentes temperaturas (5, 37 e 90 °C) utilizando cultura celular. No trabalho foram usados os biomateriais CHA5 (hidroxiapatita carbonatada sintetizada à 5°C), CHA37 (hidroxiapatita carbonatada sintetizada à 37 °C) e CHA90 (hidroxiapatita carbonatada sintetizada à 90 °C). Os autores estudaram como as células (osteoblastos do tipo MC3T3-E1) interagiram com o pó dos biomateriais, tendo estudado inclusive como varia a morfologia celular em cultura nas diferentes formas de hidroxiapatita carbonatada. Na caracterização dos biomateriais, usaram as técnicas de difração por raios X (XRD) e espectrometria por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Verificaram que a cristalinidade das amostras de CHA tem uma dependência com a temperatura, ou seja, a maior cristalinidade e maior tamanho médio de partícula foi verificada na CHA90, enquanto a CHA5 apresentou uma distribuição amorfa na XRD. Seus resultados mostraram que a viabilidade celular não foi significantemente afetada pela dispersão do pó nas amostras de CHA5 e CHA37, nem pela mudança da concentração do íon Ca^{2+} , 24h após a incubação. Os autores concluíram que a cristalinidade e tamanho médio do cristal do biomaterial não teve efeito significativo na viabilidade celular. Ademais, (LIRA *et al.*, 2020) analisaram os efeitos que a cristalinidade dos biomateriais tem no ambiente de regeneração óssea, avaliando o impacto que a diferença na cristalinidade tem na viabilidade *in vitro* de células THP-1. Os biomateriais estudados foram a CHA5 (amorfa) e CHA37, comparado à HA90 (hidroxiapatita sinterizada, sintetizada à 90 °C, cristalina). A partir de diversas análises realizadas a nível celular, seus resultados confirmaram a

biocompatibilidade dos biomateriais analisados, tendo sido observado também que nenhum deles ativou as células THP-1 e que a viabilidade de macrófagos não foi afetada pela cristalinidade dos biomateriais testados.

Ao introduzirem um novo conjunto de parâmetros associados à arquitetura do osso maduro, (REZNIKOV *et al.*, 2016) estabeleceram um novo patamar na caracterização de amostras ósseas, tendo sido, inclusive, reiterado no trabalho seguinte realizado pelo mesmo grupo (BEN-ZVI *et al.*, 2017), com o uso de amostras oriundas de animais diferentes, onde conseguiram estabelecer, a partir de seus resultados, uma clara conexão entre a organização trabecular tridimensional e o princípio de distribuição óptima espacial da tensegridade. Tais resultados motivaram o estudo de (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021), que verificaram que a organização da rede trabecular segue os princípios da tensegridade também no ambiente de reparo ósseo, tanto na amostra controle, quanto nas amostras contendo biomaterial implantado composto por hidroxiapatita carbonatada produzida à 37 °C.

(REZNIKOV *et al.*, 2016) introduziram um novo parâmetro topológico de caracterização do osso trabecular, denominado *Inter-Trabecular Angle* (ITA), que mede o ângulo entre duas trabéculas conectadas. A análise considera que as trabéculas estão conectadas em nodos (pontos de encontro entre duas ou mais trabéculas). Usando um microtomógrafo convencional (Micro XCT-400, Zeiss X-ray Microscopy, California, USA), estudaram diferentes regiões do fêmur proximal de 5 indivíduos humanos. Eles identificaram que a rede trabecular se organiza preferencialmente por nodos que conectam 3 trabéculas (3N), 4 trabéculas (4N) e 5 trabéculas (5N). Perceberam, também, que as distribuições angulares dos ângulos formados entre as trabéculas não variaram significativamente entre indivíduos, e que a média da distribuição angular é de aproximadamente 116-117° para os nodos de 3N, 107-108° para os nodos de 4N e de 102-103° para os de 5N, enquanto os ângulos presentes em estruturas de tensegridade ideais teriam média de 120°, 109,5° e 100° para os nodos 3N, 4N e 5N, respectivamente. A partir dos resultados, mostraram que os ITAs são otimizados de modo que a menor quantidade do material ósseo possível ocupe o maior volume disponível, fazendo com que a disposição tridimensional do osso trabecular seja mais bem adaptada à carga, contribuindo para a estabilização e redistribuição do estresse no maior número de trabéculas do tecido ósseo. Com isso, conseguiram estabelecer uma conexão entre as características topológicas entre a rede trabecular e o princípio de tensegridade.

Dando continuidade à sua pesquisa direcionada à arquitetura trabecular, o mesmo grupo realizou um novo estudo envolvendo o parâmetro de ângulos intra-trabeculares, desta vez com intuito de validar o algoritmo e sua aplicação em outros sistemas, tanto biológicos quanto manufaturados (BEN-ZVI *et al.*, 2017). Para investigar a arquitetura trabecular em sistemas biológicos usaram amostras ósseas de côndilo mandibular e fêmur de porcos adultos. Avaliaram, também, estruturas tridimensionais como cortiça e materiais compostos por redes metálicas confeccionados em impressoras 3D, onde os nodos e as partes que se conectam neles era bem conhecida, tendo sido estabelecida durante a fabricação, mas com posicionamento randomizado. Dentre as amostras ósseas, os resultados apontaram para uma semelhança entre os ângulos intra-trabeculares nas amostras suínas com os resultados obtidos nas amostras humanas anteriormente por (REZNIKOV *et al.*, 2016). Além disso, a análise do côndilo mandibular mostrou que os nodos planos do tipo 3N tem um alinhamento preferencial definido pelo sentido da força aplicada no mesmo. Puderam, a partir de seus resultados, observar que a relativa alta anisotropia da cabeça do côndilo é alcançada através da transformação do padrão da rede trabecular, dado por uma orientação preferencial dos nodos 3N planos. No geral, o algoritmo de análise de ângulos intra-trabeculares se mostrou uma ferramenta robusta na análise dessas estruturas, enquanto o parâmetro em si denota características relevantes na análise de redes trabeculares, mostrando inclusive que ele se mantém conservado entre diferentes espécimes, mas tem seus valores alterados localmente devido à aplicação de estresse.

Para investigar se a organização da arquitetura trabecular está presente também em trabéculas formadas durante o período de reparo ósseo, (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021) utilizaram a técnica de SR-microCT para estudar a arquitetura trabecular do osso neoformado em defeito não crítico de tibia de ratos, na presença e na ausência de biomaterial de hidroxiapatita carbonatada. No modelo utilizado, é realizado um defeito circular (2 mm de diâmetro, não crítico) na região da diáfise do animal, no qual são implantadas as microesferas de biomaterial (neste caso, hidroxiapatita carbonatada sintetizada à 37°C) em um grupo de animais, enquanto no outro é feito somente o defeito. Ao fim do tempo experimental definido (neste caso foram usados os tempos de 7, 14 e 21 em animais sem material implantado e 21 dias no grupo de animais implantados), os ratos foram eutanasiados e a tibia, previamente operada, é extraída, possibilitando os estudos de microtomografia. A análise de SR-microCT

dos diferentes grupos possibilitou a caracterização da evolução da arquitetura trabecular em um defeito não crítico de tíbia nos períodos estudados, possibilitando a correlação dos resultados obtidos entre os grupos de 21 dias, com e sem biomaterial. Foi verificado que a rede trabecular do osso novo possui uma arquitetura bem organizada, como visto por (REZNIKOV *et al.*, 2016). Neste caso, observaram que os ângulos intra-trabeculares do grupo implantado por CHA, 21 dias após o implante, apresentavam distribuições gaussianas, com valores médios de 114,5°, 105,8° e 97,8° para os nodos do tipo 3N, 4N e 5N, respectivamente. Tais valores, especialmente para os nodos do tipo 3N e 4N, se assemelham aos encontrados em estruturas ideais de tensegridade (120 ° e 109,5 ° respectivamente). Além disso, compararam seus resultados com os obtidos por (REZNIKOV *et al.*, 2016), tendo encontrado resultados semelhantes, indicando que o osso novo, formado durante a regeneração óssea neste tipo de defeito, já apresenta a organização trabecular observada em ossos maduros, mesmo na presença do biomaterial estudado. Foi verificado que o material possibilitou osteocondução, favorecendo a formação do osso neoformado a partir de conexões trabeculares em fragmentos do material, bem como com as paredes corticais internas da tíbia; e que a fragmentação do biomaterial resultou em partículas com diâmetro equivalente entre 20-400 μm . Finalmente, observaram no grupo implantado diferenças em características morfológicas como espessura e separação trabecular, mas mantiveram as configurações geométricas similares ao grupo sem material.

Este trabalho tem como principal motivação a análise da arquitetura trabecular formada em defeitos ósseos na presença de diferentes biomateriais à base de fosfato de cálcio, o que significa também avaliar se o padrão observado por (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021) se mantém na presença de biomateriais com padrões de fragmentação diferentes, uma vez que isso influencia diretamente tanto no espaço disponível para o crescimento das trabéculas no defeito, quanto na superfície disponível para fixação de células que protagonizam a regeneração óssea. Para tal, foram usados biomateriais com perfis diferentes de fragmentação *in vivo* que já tiveram sua biocompatibilidade e osteocondutibilidade atestada previamente (MAVROPOULOS *et al.*, 2011, VALIENSE *et al.*, 2015, KAMMER *et al.*, 2016, LIRA *et al.*, 2020).

3. Fundamentação Teórica

Neste capítulo são discutidos os tópicos teóricos e conceitos básicos considerados fundamentais para a compreensão do trabalho. Inicialmente, são descritos aspectos gerais concernentes ao tecido ósseo, bem como pontos mais específicos, como aspectos sobre o osso trabecular e o processo de reparo ósseo, o papel de biomateriais na regeneração óssea, detalhando aspectos sobre os constituintes de hidroxiapatita. Em seguida, é dada uma breve explicação sobre tensão e rigidez. Finalmente, são descritas as principais propriedades da técnica de microCT, desde a fonte de raios X à quantificação de parâmetros na imagem digital reconstruída.

3.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo, caracterizado especialmente por conter a mineralização de sua matriz em seu processo de formação. A matriz mineralizada faz com que o osso seja um tecido extremamente resistente, o que possibilita que os ossos sirvam tanto como suporte estrutural e mecânico aos animais vertebrados, mas contribuindo também para seu movimento, bem como na proteção de órgãos internos. O osso é constituído por uma parte orgânica e uma inorgânica. A parte orgânica do osso é principalmente composta por colágeno tipo I, apesar de também conter colágeno tipo V, III, XI e XIII (sendo os últimos três observados apenas residualmente). A inorgânica consiste principalmente no mineral de fosfato de cálcio – na forma de cristais de hidroxiapatita – e em pequenas quantidades de íons de magnésio, potássio, sódio e citrato, além de água. Ademais, o osso serve como regulador do pH sanguíneo e reservatório de aminoácidos, bicarbonatos e minerais fundamentais para o equilíbrio iônico do organismo – especialmente cálcio e fósforo –, disponibilizando-os ao organismo conforme necessário, além de possuir funções metabólicas na secreção de hormônios que regulam o metabolismo mineral e energético (VENKATESAN *et al.*, 2015, ROSS e PAWLINA, 2016, JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2018, OTT, 2018, BUFFRÉNIL *et al.*, 2021).

O osso é um tecido altamente complexo e dinâmico, cuja organização hierárquica se diferencia nas diversas escalas (Figura 1). A escala macroscópica compreende os ossos enquanto órgãos que constituem o esqueleto (e.g. fêmur, tíbia, úmero), na escala

micrométrica se encontram as trabéculas (inclusive as que se formam em fase de crescimento ósseo em um defeito, como as estudadas neste trabalho), já na escala nanométrica se observam as células formadoras de osso (osteoblastos e osteócitos), fibrilas de colágeno e seus aglomerados, presentes no início do processo de mineralização (BUSS *et al.*, 2022).

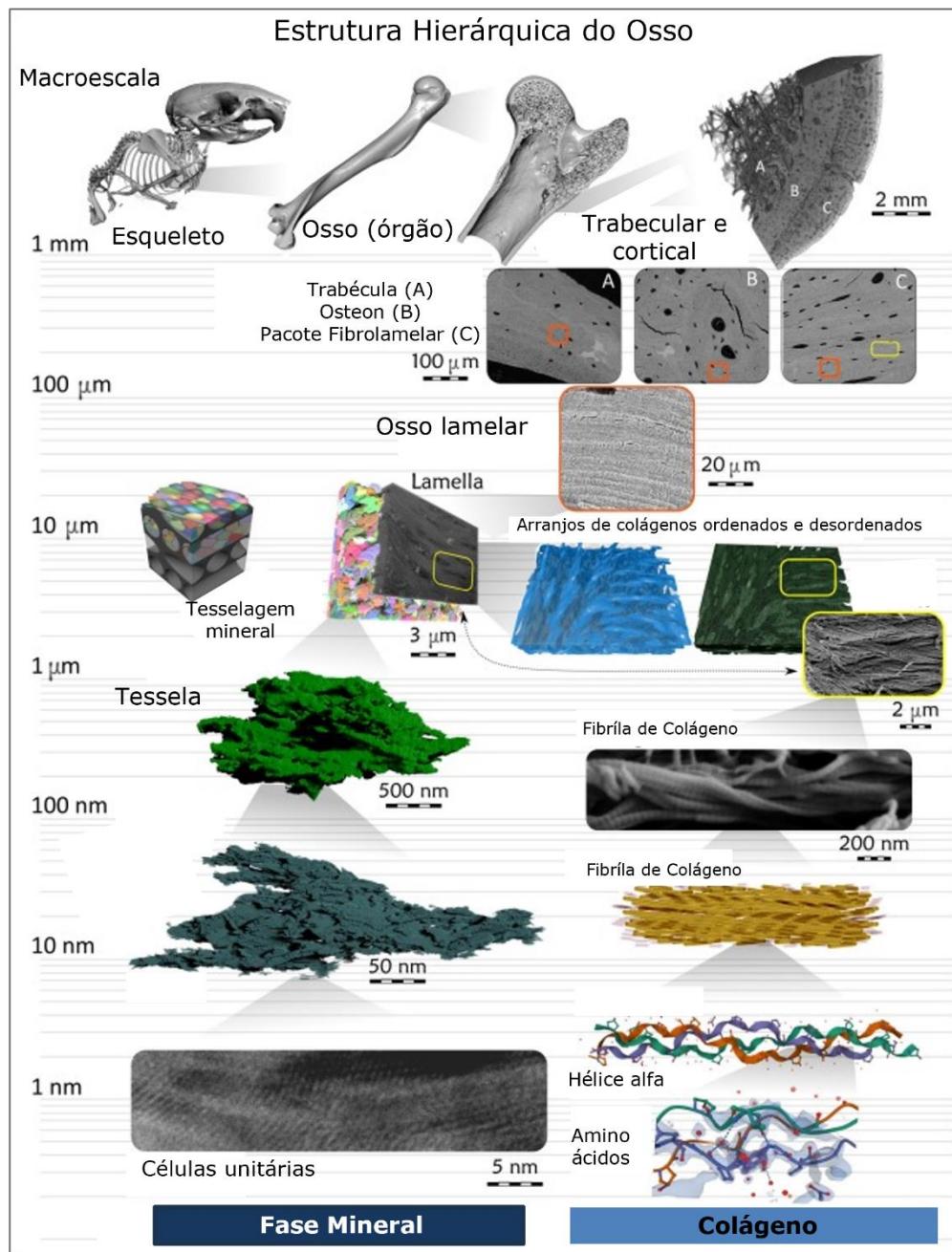


Figura 1: Estrutura hierárquica do osso em diferentes escalas (adaptado de BUSS *et al.*, 2022).

3.1.1 Estrutura Óssea na Microescala

O tecido ósseo pode ser classificado como trabecular (ou esponjoso) ou cortical (compacto). O osso cortical é mais denso e compacto, e envolve os ossos (Figura 2), enquanto o osso trabecular consiste em uma rede de segmentos ósseos interconectados que preenchem regiões internas dos ossos, cujos espaços entre os segmentos são ocupados por tecido medular e vasos sanguíneos.



Figura 2: Corte longitudinal de uma tíbia. Região maximizada contém osso trabecular (esquerda) e cortical (direita). Fonte: ROSS, 2016.

3.1.2 A Regeneração Óssea

O reparo ósseo é um processo dinâmico e complexo, com especificidades quanto ao tamanho e posição da lesão, tipo de osso lesionado (trabecular ou cortical), e à disponibilidade celular (MONFOULET *et al.*, 2010). O processo pode ser classificado, em

termos gerais, como direto – também denominado como primário, quando a fratura é estabilizada com material compressor que restringe o movimento –, ou indireto, chamado também de secundário, em lesões tratadas com algum tipo de aparato de fixação não- ou semi-rígido, havendo algum nível de movimento na região lesionada (ROSS, 2016, CHOI, 2023).

O processo indireto é o mais comum, e é protagonizado pelas atividades celulares que envolvem os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células ósseas osteoprogenitoras (CHOI, 2023). Neste processo, após a lesão, há uma resposta inflamatória na região, que sucede a formação de um hematoma (coágulo sanguíneo). Em seguida, a mineralização ocorre, substituindo gradativamente o hematoma por tecido granular. A região é, então, gradualmente calcificada, e o tecido granular é mineralizado até ser transformado em osso trabecular, formando um calo ósseo no local. Finalmente, com o remodelamento ósseo o calo é reestruturado de modo que o osso retome sua forma original (EINHORN e GERSTENFELD, 2014, ROSS, 2016, KNOX *et al.*, 2020, CHOI, 2023).

3.2 Biomateriais e seus Mecanismos de Atuação

Biomateriais dos mais variados tipos são utilizados na biomedicina com diferentes fins, alguns destes são aparelhos biomédicos (e.g. biossensores), órgãos artificiais, tratamento imunológico e implantes (PIRES *et al.*, 2015, WEBBER *et al.*, 2016, JANA *et al.*, 2023). O desenvolvimento de materiais que visam auxiliar a regeneração tecidual é um campo crescente, particularmente aqueles voltados para o reparo ósseo (ZHOU *et al.*, 2021).

O processo de regeneração óssea pode ser beneficiado com a introdução de biomateriais na região lesionada. Os mecanismos através dos quais os biomateriais podem auxiliar na regeneração são a osteocondução, osteoindução e a osteogênese (ALBREKTSSON e JOHANSSON, 2001, MARX, 2007, HABIBOVIC e BARRALET, 2011). Todos ocorrem naturalmente no organismo, e o emprego de um biomaterial visa estimular um ou mais destes fenômenos. A osteocondução é a formação de osso novo a partir de um material (ou osso) adjacente, e um material osteocondutor deve ser capaz de promover um bom ambiente para osteoblastos e células osteoprogenitoras, permitindo o crescimento destas nas superfícies e interior do material (ALBREKTSSON e JOHANSSON, 2001,

FERNANDEZ *et al.*, 2019). A osteoindução consiste na formação de osso pelo recrutamento, transformação, diferenciação e proliferação de células tronco em células formadoras de osso (osteoblastos) (MARX, 2007, WINKLER, 2018, FERNANDEZ *et al.*, 2019, PAWELEC e PLANELL, 2019). A osteogênese é o processo no qual o novo osso cresce a partir do enxerto de material ósseo, tipicamente oriundo do próprio indivíduo, mas também de biomateriais (FERNANDEZ *et al.*, 2019).

3.3 Classificação dos Biomateriais

Os biomateriais usados na regeneração óssea são divididos entre os sintéticos (PIRES *et al.*, 2021) e os naturais. Os últimos são classificados pela origem do material, e podem ser autógenos (MIRON *et al.*, 2013), alógenos (O-SUNG *et al.*, 2017) e xenógenos (MENDOZA-AZPUR *et al.*, 2019), como observado na Figura 3. Biomateriais autógenos, derivados de material ósseo do próprio paciente, são os mais utilizados clinicamente (QU *et al.*, 2019, BERNARDI *et al.*, 2020). No entanto apresentam desvantagens significativas, como o risco de infecção e inflamação, a produção de um hematoma no local de extração – uma vez que a retirada do material ósseo do próprio paciente requer outra cirurgia –, bem como a limitação de uso. Materiais alógenos, constituídos de osso oriundo de banco de ossos ou doador humano específico, são também muito usados e compensam a dificuldade de disponibilidade de material doador. Porém, sua utilização está associada a riscos de infecção, transmissão de doenças e a respostas imunológicas no organismo. (QU *et al.*, 2019, WEI *et al.*, 2020). Materiais xenógenos são derivados de osso oriundo de alguma espécie animal, geralmente bovina ou suína (MENDOZA-AZPUR *et al.*, 2019, CHEN *et al.*, 2020). Estes estão associados aos mesmos riscos que os alógenos, somada a possibilidade de transmissão de zoonoses, mas por outro lado sua disponibilidade é virtualmente ilimitada (WEI *et al.*, 2020, BATTAFARANO *et al.*, 2021). Biomateriais sintéticos possuem uma série de vantagens em relação aos demais, especialmente devido ao risco nulo de transmissão de doenças e por induzirem mínima reação imunológica, além da capacidade de personalizar o tratamento de acordo com o paciente. Portanto, sua maior vantagem reside no potencial de desempenhar tão bem quanto os autógenos. Todavia, seu principal desafio consiste em tornar

sua aplicação financeiramente viável, ao mesmo tempo em que mantém sua funcionalidade equiparável à dos autógenos. (PEREIRA e HABIBOVIC, 2018).

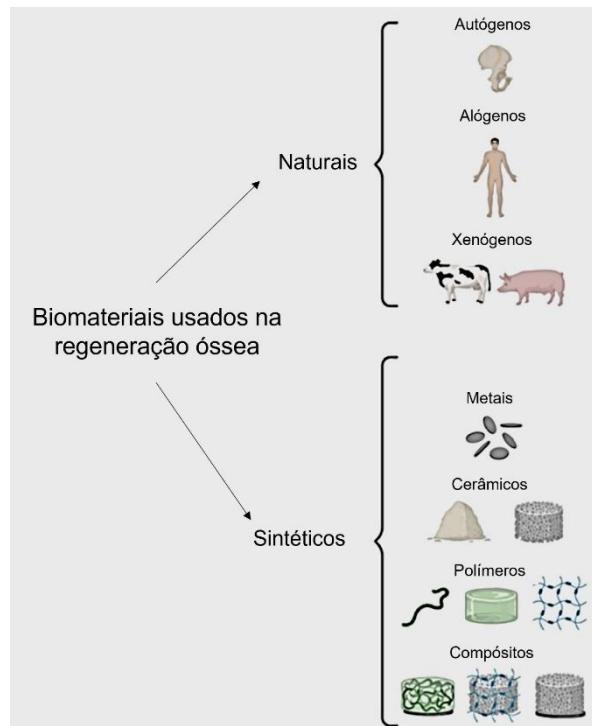


Figura 3: Classificação dos Biomateriais usados na regeneração óssea quanto à sua composição. Adaptado de (BATTAFARANO *et al.*, 2021).

Os biomateriais sintéticos são classificados quanto ao material que os compõe, podendo ser cerâmicos (MA *et al.*, 2018, DIAZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2019), metais (NIINOMI, 2019), polímeros (BHARADWAZ *et al.*, 2020, GUO *et al.*, 2021) e seus compósitos (ZHANG *et al.*, 2018, QU *et al.*, 2019, KOONS *et al.*, 2020). Dentre os compósitos, estão os alginatos, que compõem os biomateriais utilizados neste trabalho. Alginatos são biopolímeros que podem ser encontrados naturalmente na biota marinha, podendo ser trabalhados em diversas formas, sendo as principais os hidrogéis (BENDTSEN *et al.*, 2017) e micro/nanoesferas (CALASANS-MAIA *et al.*, 2019). Dentre suas principais vantagens estão sua biocompatibilidade e alta biodegradação, bem como seu baixo custo relativo, fácil gelificação iônica – técnica pela qual são sintetizadas micro/nanomateriais, onde interações eletrostáticas de moléculas de cargas opostas resultam em partículas estáveis (CALVO *et al.*, 1997, HOANG *et al.*, 2022) –, serem não tóxicos e por poderem ser quimicamente modificados com ligantes de adesão (VENKATESAN *et al.*, 2015;

PAWELEC e PLANELL, 2019, SU *et al.*, 2023). Nos biomateriais utilizados neste trabalho, o alginato compõe a matriz das microesferas que contém as nanopartículas de hidroxiapatita, atuando como suporte estrutural para as células que atuam na formação de osso novo (osteoblastos), permitindo a regeneração do tecido ósseo enquanto são fragmentados através da ação de enzimas no organismo.

3.4 A Hidroxiapatita e Hidroxiapatitas Substituídas

A parte inorgânica do osso, dentina e esmalte dentário são constituídas principalmente por uma matriz mineral de cristais de uma fase não estequiométrica de hidroxiapatita (HA, comumente referida por apatita biogênica ou bioapatita), um mineral pertencente aos fosfatos de cálcio classificados como apatitas. Assim, as propriedades químicas da HA se assemelham fortemente às da apatita biológica que constitui a parte inorgânica do osso (JIANG *et al.*, 2019; ARCOS e VALLET-REGÍ, 2020). Tais similaridades fazem da HA um material bioativo, biocompatível e osteocondutor, conferindo-a um papel importante na confecção de biomateriais em diversas aplicações biomédicas (LIRA *et al.*, 2020, LU *et al.*, 2018). Podem ser destacadas as aplicações de hidroxiapatita como revestimento de implantes metálicos (LI *et al.*, 2015, AWASTHI *et al.*, 2021), agente de liberação de medicamentos (CALASANS-MAIA *et al.*, 2019, LARA-OCHOA *et al.*, 2021) e matriz de biomateriais compósitos (MARTINEZ-ZELAYA, 2018). Ademais, também foi verificado que a HA possui propriedades antibacterianas e anticancerígenas, favorecendo seu uso como sistema de entrega de genes, proteínas e radionuclídeos, bem como no diagnóstico de doenças (MUNIR *et al.*, 2021, FIUME *et al.*, 2021, LAMA-ODRÍA *et al.*, 2022).

A hidroxiapatita (HA) pertence a um vasto grupo de fosfatos de cálcio utilizados na confecção de biomateriais, cuja composição química é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, apesar de usualmente ser retratada como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ de modo a indicar que sua célula unitária é composta por duas unidades fórmulas na célula cristalográfica (WOPENKA e PASTERIS, 2005, HOU *et al.*, 2022). A estrutura cristalina da HA possui arranjo molecular hexagonal, pertencendo ao grupo espacial ($\text{P}6_3/\text{m}$), onde íons de fosfato e cálcio circundam colunas de íons de hidroxila (OH^-) (SHEPHERD *et al.*, 2012, RATNAYAKE *et al.*, 2016). As dimensões da célula unitária da rede são de 9.432 Å para a e b , e 6.881 Å para c (ARCOS e VALLET-

REGÍ, 2020). A HA estequiométrica possui razão molar de Ca/P de 1.67, com 39.68 % e 18 % de sua massa de Ca e P, respectivamente, e é o fosfato de cálcio mais estável em níveis de pH entre 4-12 (USKOKOVIC *et al.*, 2010, RATNAYAKE *et al.*, 2016, WEI *et al.*, 2020).

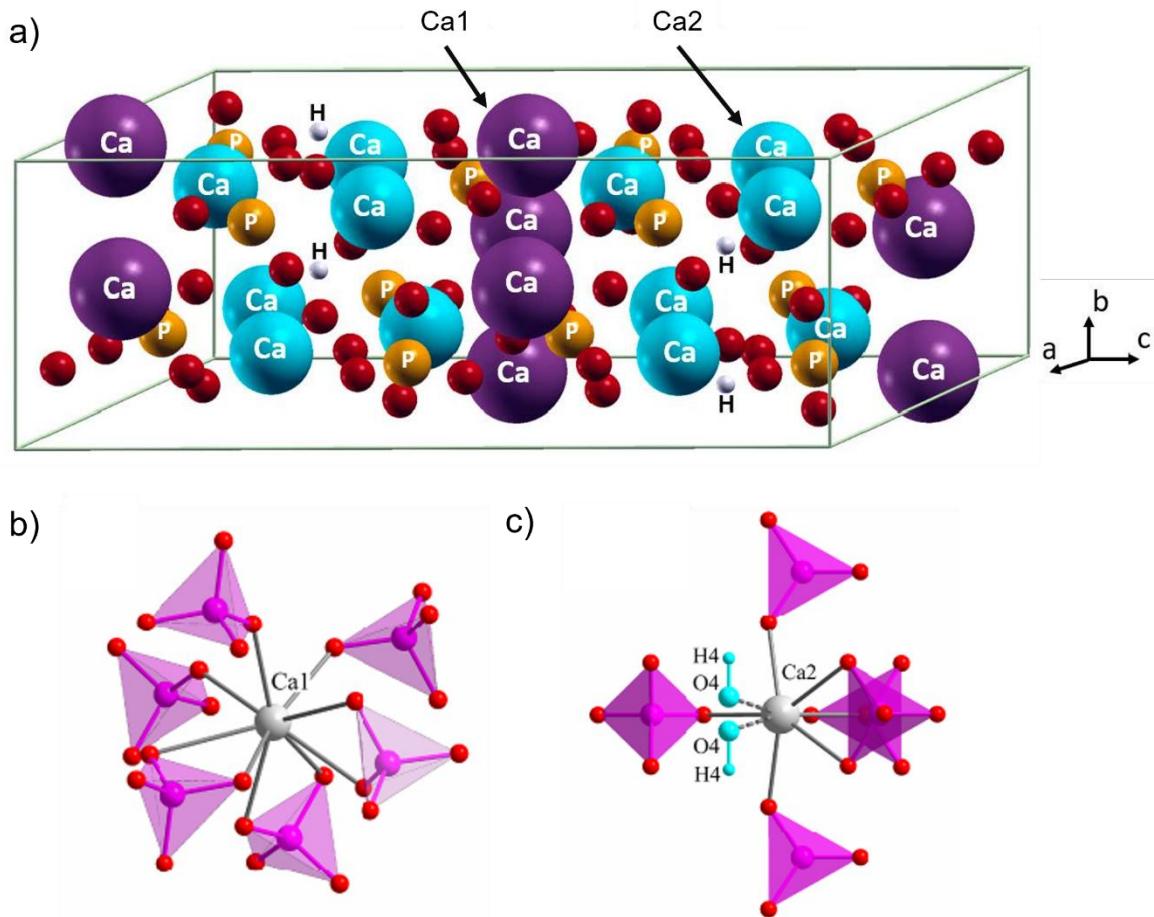


Figura 4: Estrutura da Hidroxiapatita. a) Arranjo molecular da rede de HA, destacando as posições Ca1 e Ca2 ocupadas pelos átomos de cálcio, que podem ser ocupados por outros íons em substituições catiônicas. Vizinhanças dos sítios b) Ca1 e c) Ca2. Átomos de O em vermelho. Figura adaptada de MAKSHAKOVA *et al.*, 2022 e RENAUDIN *et al.*, 2008.

A estrutura de rede comum às apatitas pode ser escrita na forma geral $A_5(BO_4)_3X$, onde, no caso da hidroxiapatita, A, B e X representam Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- , respectivamente. No entanto, a família de apatitas compreende também outras substituições, sejam elas catiônicas, nas posições A (e.g. Cd^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} ou Mg^{2+}), ou anionicas, nas posições B (e.g. CO_4^{2-} , SO_4^{2-}) e X (e.g. F^- , Cl^- ou CO_3^{2-}) (USKOKOVIC e USKOKOVIC, 2010, RATNAYAKE *et al.*, 2016). Substituições iônicas na estrutura da bioapatita ocorrem naturalmente a partir de íons presentes no organismo. A substituição anionica mais recorrente

é a dos carbonatos (CO_3^{2-}), observados em níveis entre 5-8% (em peso) no material ósseo, formando a hidroxiapatita carbonatada (CHA), que é utilizada como referência neste trabalho (MARTINEZ-ZELAYA, 2018). O íon CO_3^{2-} pode ocupar tanto a posição do íon hidroxila, OH^- (tipo A), quanto do fosfato, PO_4^{3-} (tipo B). No caso da substituição do tipo B, de modo a manter o equilíbrio de carga, cátions de Na^+ ou K^+ costumam ser incorporados no lugar de Ca^{2+} . As substituições também podem acarretar mudanças estruturais nos parâmetros de rede, morfologia, solubilidade e simetria hexagonal (LIN *et al.*, 2015, JIANG *et al.*, 2019). Estudos demonstraram que a taxa de biodegradação de biomateriais à base de hidroxiapatita co-substituída é significativamente maior que a de biomateriais compostos por HA pura, o que configura uma forte vantagem no uso destes materiais para a regeneração óssea (LIN *et al.*, 2011, LIN *et al.*, 2015).

Dentre as substituições catiônicas utilizadas em biomateriais, a substituição de cálcio por estrôncio se destaca, sendo usado tanto na forma de substituição em hidroxiapatita (SrHA, SANGEETHA *et al.*, 2018) quanto na hidroxiapatita carbonatada (SrCHA, VALIENSE *et al.*, 2015), sendo a última uma das amostras analisadas neste trabalho. Sr é encontrado no tecido ósseo em pequenas quantidades – aproximadamente 0.00044% da massa corporal, ou cerca de 14 g em um ser humano adulto (RATNAYAKE *et al.*, 2016, ARCOS e VALLET-REGÍ, 2020). Acumulado de modo similar ao Ca no esqueleto, o estrôncio substitui em torno de 0.035% do Ca presente na fase mineral do osso em humanos com dieta normal (WATTS e HOWE, 2010, JIANG *et al.*, 2019, MARX *et al.*, 2020). O estrôncio desempenha um papel fundamental no metabolismo ósseo, tendo sido verificado em concentrações significativamente maiores em regiões de maior taxa de renovação metabólica, estando, portanto, mais presente em regiões de formação de osso novo do que em regiões de osso maduro (MARIE *et al.* 2001, SHEPHERD *et al.* 2012). Em biomateriais, a substituição de Ca^{2+} por Sr^{2+} aumenta a atividade de osteoblastos – estimulando a formação de osso novo –, ao passo que inibe a proliferação de osteoclastos, além de aumentar a densidade mineral óssea (ROSSI *et al.*, 2014, SANGEETHA *et al.*, 2018, JIANG *et al.*, 2019, ARCOS e VALLET-REGÍ, 2020). Ainda, estudos demonstraram que a adição de 5% de Sr na estrutura de CHA aumentam a fragmentação e osteocondução do biomaterial (VALIENSE *et al.*, 2015, SARTORETTO *et al.*, 2020).

3.5 Princípios Gerais da Tensegridade

A palavra “tensegridade” advém da contração entre “tensional” e “integridade”, e foi inicialmente cunhada pelo artista e arquiteto estadunidense Richard Buckminster Fuller, em 1975 (FULLER, 1975), apesar de seus conceitos datarem do início do século XX. As Figuras 5-a,b ilustram obras artísticas concebidas pelo artista Kenneth Snelson, aluno de Fuller.

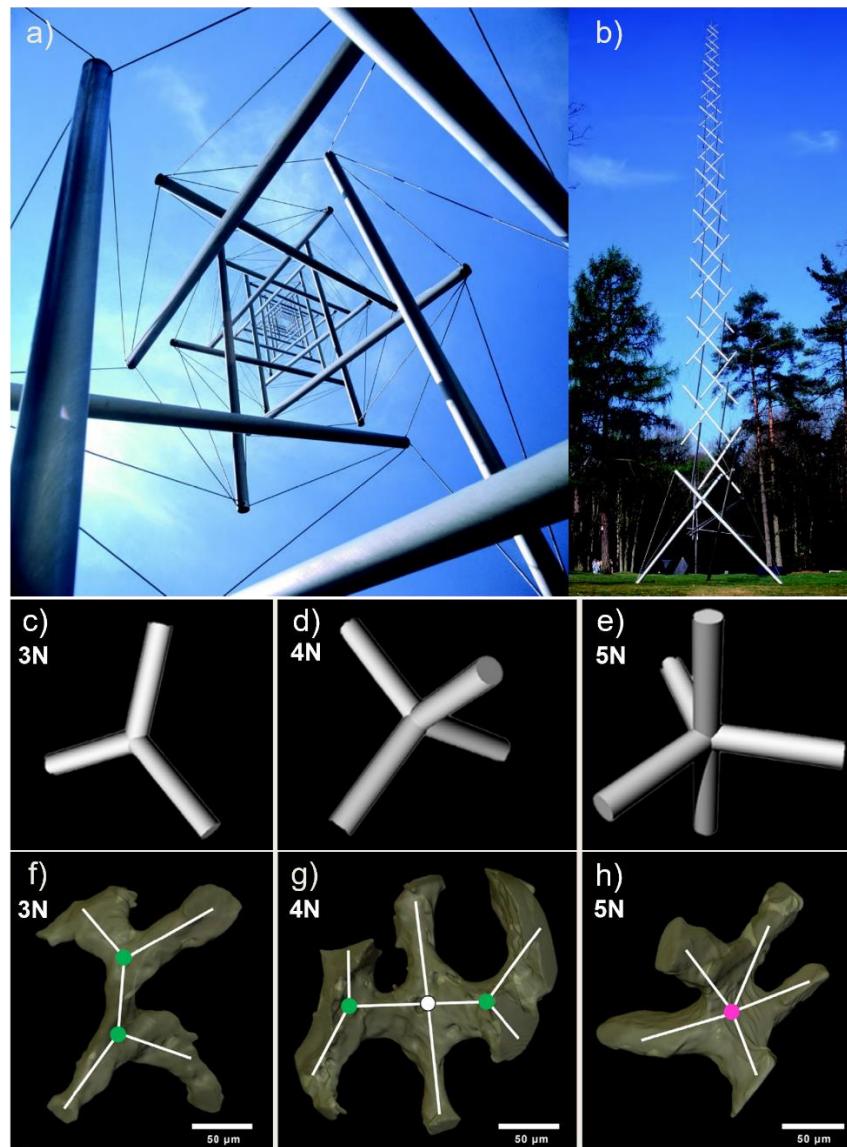


Figura 5: Estruturas arquitetônicas de tensegridade em a) Needle Tower, 1968 (18.2 x 6 m) e b) Needle Tower II, 1969 (30 x 6 m). c-e) Estruturas ideais de tensegridade com 3, 4 e 5 hastas. f-g) Conexões trabeculares com padrões de estruturas de tensegridade. Figura adaptada de SNELSON e HEARTNEY, 2013, REZNIKOV et al., 2016 e Martinez-Zelaya et al., 2021, respectivamente.

Uma estrutura construída a partir dos princípios de tensegridade tem sua estabilidade mantida em equilíbrio a partir da tensão de elementos estruturais contínuos (e.g. cabos, cordas) e elementos estruturais descontínuos (e.g. hastes), em compreensão. Assim, dois elementos estruturais compõe a estrutura: os cabos, componentes flexíveis e globais, e as hastes, componentes rígidos e locais (ZHANG e OHSAKI, 2015). Outras características destas estruturas são: capacidade de autoestabilização, a partir da reconfiguração de seus elementos de acordo com uma força externa; os elementos estruturais mantêm-se retos e as hastes não se conectam nas extremidades (ZHANG e OHSAKI, 2015).

Originalmente, os conceitos de tensegridade foram utilizados no meio artístico, mas outras áreas também se beneficiariam destes princípios, especialmente a biologia – em estudos voltados para as relações mecanobiológicas em células e tecidos, e a arquitetura trabecular óssea (INGBER, 2008, REZNIKOV, 2016, BOGHADY *et al.*, 2021, INGBER, 2023) – e áreas da engenharia voltadas para o desenvolvimento de materiais com a capacidade de resistir e se adaptar à ação de forças externas (OLIVEIRA e SKELTON, 2009, FRATERNALI *et al.*, 2020). Estruturas de tensegridade também são morfologicamente caracterizadas por formas estáveis no plano bidimensional (como triângulos) ou tridimensionais (tetrahedros) (REZNIKOV, 2016).

3.6 Microtomografia Computadorizada por Raios X (MicroCT)

A microCT é uma técnica não destrutiva de imageamento por raios X, que permite a análise visual e quantitativa de estruturas internas de amostras na escala de micrômetros, tratando-se de tomógrafos de bancada, que compõe a maioria das aplicações, ou até na escala de centenas de nanômetros, que pode ser obtido em laboratórios cuja fonte é radiação sincrotron. Nesta seção são discutidos os aspectos que fundamentam a técnica. Inicialmente, é descrito um breve histórico do desenvolvimento da técnica, da descoberta dos raios X ao desenvolvimento dos primeiros equipamentos de microCT, em seguida são descritos conceitos teóricos imprescindíveis para a compreensão desta técnica de imageamento, desde a aquisição das imagens, passando pelo tratamento das mesmas, até a quantificação de parâmetros.

3.6.1 Breve histórico

A origem do imageamento por raios X está intrinsecamente relacionado à própria descoberta deste tipo de radiação eletromagnética. Em novembro de 1895, o físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923) realizou a descoberta de um novo tipo de radiação com capacidade de penetrar objetos, denominada por ele como “Raios X”, pela qual ganhou o Prêmio Nobel de Física em 1901. Ainda nas semanas seguintes, o próprio Röntgen obteve a primeira imagem radiográfica, revolucionando a medicina diagnóstica para sempre (BUZUG, 2008, ATTWOOD, 2016, ORHAN, 2020).

Em uma imagem radiográfica, o contraste em níveis de cinza se deve à diferença na qual os materiais presentes na amostra absorvem os raios X. Como a capacidade de absorção está diretamente relacionada à densidade, a técnica possibilita o estudo de estruturas internas da amostra em projeções bidimensionais. No caso médico, por exemplo, é possível facilmente distinguir, em uma radiografia, entre algum osso do paciente e tecido mole na região radiografada, como a pele, possibilitando os diagnósticos de lesões. A limitação da técnica está no seu caráter bidimensional, por se tratar de uma projeção, informações tridimensionais relevantes podem ser ocultadas (LANDIS, 2010).

A tomografia computadorizada (CT), por outro lado, minimiza esta limitação. A técnica consiste na aquisição de projeções (ou radiografias digitais) de uma amostra, enquanto esta é rotacionada em torno de um mesmo eixo (LANDIS, 2010), em passos angulares fixos (e.g. 1°, 0,5° ou 0,3°). A reconstrução das imagens – ou seja, a obtenção do modelo 3D digital que representa a amostra real a partir de projeções bidimensionais – se tornou matematicamente possível a partir do trabalho do matemático austríaco Johann Radon, que em 1917 introduziu um método matemático de reconstrução que veio a ser conhecido como transformada de Radon, bem como sua transformada inversa. Nele, é demonstrado que a reconstrução de um objeto tridimensional poderia ser obtida a partir de infinitas projeções bidimensionais do mesmo objeto (RADON, 1917, ORHAN, 2020). No entanto, somente em 1963 o físico sul-africano Allan MacLeod Cormack (1924-1998) efetivamente demonstrou que era possível usar um número finito de projeções radiográficas, realizadas em diferentes direções com relação à amostra (rotação mínima de 180°) para reconstruir a distribuição de absorção de raios X em uma seção transversal de um objeto

(CORMACK, 1963). Desenvolveu, além do método matemático para o cálculo destas distribuições de absorção, um protótipo de tomógrafo para demonstrar sua viabilidade na prática, tendo publicado seus primeiros achados em 1963 e 1964. Paralelamente, o engenheiro elétrico Codfrey Hounsfield (1919-2004), que também trabalhava no problema, construiu o primeiro equipamento de CT comercial para uso médico, tendo sido muito usado nos anos subsequentes (GONZALEZ e WOODS, 2018, STOCK, 2020). Pelas contribuições nas aplicações médicas da tomografia, Cormack e Hounsfield ganharam o Prêmio Nobel de Medicina em 1979 (PETRIK *et al.*, 2006, BUZUG, 2010).

A tomografia computadorizada impactou profundamente a medicina, possibilitando e facilitando diagnósticos. Os equipamentos de CT comerciais são eficientes em resolver inúmeros problemas médicos, como a identificação de fraturas ou tumores (LANDIS, 2010), por outro lado, a resolução espacial das imagens é da ordem de 1 mm (ORHAN, 2020), o que limita suas aplicações para outros campos. Ao longo das décadas que sucederam as primeiras tomografias, muitos esforços foram empregados no desenvolvimento de equipamentos mais sofisticados, possibilitando o surgimento da técnica de microCT, que segue os princípios da CT, mas permite diferenciar estruturas micrométricas. Enquanto na CT médica o paciente permanece parado e o conjunto composto por fonte de raios X e detector são rotacionados, num sistema de microCT típico de laboratório é a amostra que é rotacionada enquanto são realizadas projeções com a fonte de raios X e o sistema de detecção estacionados. O primeiro ensaio utilizando a microCT foi realizado em 1982 (STOCK, 2020), onde (ELLIOT e DOVER, 1982) descrevem um equipamento com resolução espacial de cerca de 15 μm , tendo sido utilizada uma concha de 0.5 mm de diâmetro como amostra.

A microCT foi profundamente beneficiada pelo advento da radiação sincrotron, trazendo uma série de vantagens com relação aos sistemas de microCT convencionais, especialmente devido ao seu alto brilho e o foco, que pode chegar à escala nanométrica. Por outro lado, a viabilidade de experimentos em laboratórios de microCT por radiação sincrotron (SR-microCT) é significativamente menor do que a de equipamentos de microCT convencionais devido às altas demandas de usuários nestes laboratórios e ao alto custo operacional envolvido na sua manutenção.

Seja como microCT ou SR-microCT, a microtomografia vem sendo utilizada nas últimas décadas nas mais diversas aplicações, tanto industriais quanto científicas e nas mais variadas áreas, desde a paleontologia (KEKLIKOGLOU *et al.*, 2018, DOS SANTOS *et al.*, 2023) ao estudo de materiais (SANCHES *et al.*, 2023, ARAÚJO *et al.*, 2023). A técnica tem suas raízes na área médica, e continua sendo muito utilizada até hoje nos mais diversos estudos nas áreas de biomedicina, bioengenharia e saúde como um todo (CAMPIONI *et al.* 2020, MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2022, REDENTE, 2023).

3.6.2 Princípios Gerais da MicroCT

Em um experimento de microtomografia, uma amostra é posicionada entre uma fonte de raios X e um detector cintilador. A amostra é rotacionada em torno do próprio eixo em um passo angular fixo, enquanto projeções (radiografias) são adquiridas em cada posição (Fig. 6), completando uma rotação completa (360°) ou parcial (180°). O conjunto de projeções é então levado a um software especializado para a reconstrução da imagem digital, que pode ser visualizada e analisada em séries de cortes transversais bidimensionais ou em seu volume.

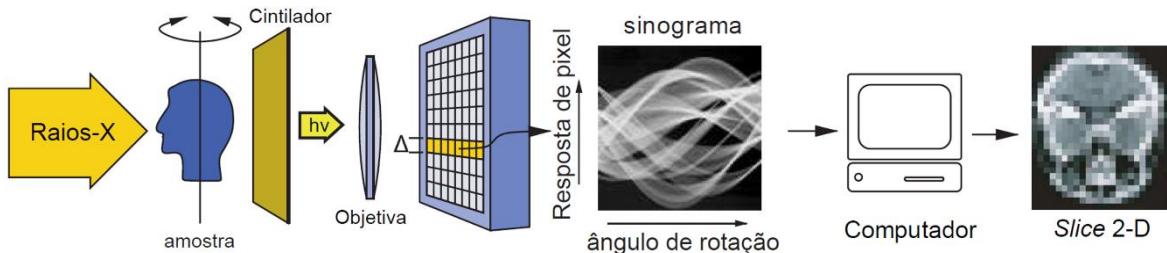


Figura 6: Princípios gerais da microtomografia computadorizada por raios X (adaptado de WILMOTT, 2019). Um feixe paralelo de raios X interage com a amostra, o feixe transmitido é captado por um cintilador, magnificado por uma lente objetiva, e o sinal resultante é captado por uma câmera CCD. O processo é repetido para diferentes posições da amostra, que rotaciona em seu próprio eixo, gerando, como função da resposta de pixel em cada linha (dimensão Δ) e o ângulo de rotação, um sinograma, que são utilizados para gerar tomogramas bidimensionais em um computador. Ao fim das aquisições é realizada a reconstrução da imagem 3D digital a partir do conjunto de tomogramas.

3.6.1 Princípios Físicos

A imagem digital reconstruída consiste em uma imagem em níveis de cinza, cujo contraste é oriundo da atenuação do feixe (i.e. perda de intensidade) conforme este interage com a amostra. Tal atenuação se dá pela interação entre os fótons do feixe e os átomos da amostra. Nas faixas de energia dos fótons dos feixes de raios X compreendidas neste trabalho (até 60 keV), a interação entre os fótons e a matéria se dá basicamente pelo efeito fotoelétrico e espalhamento Compton (BOUXSEIN, 2010), que se dão entre os fótons incidentes na amostra e os átomos da mesma. No efeito fotoelétrico, ou absorção fotoelétrica, um fóton é absorvido por um átomo, transferindo toda sua energia para um elétron do mesmo, que é ejetado com uma energia cinética igual à energia do fóton incidente decrescida da energia de ligação do elétron. Por outro lado, no espalhamento Compton a interação do fóton com um átomo da amostra resulta em um fóton espalhado (com energia menor que o incidente), além de um elétron espalhado. Enquanto o efeito fotoelétrico é altamente dependente da energia do fóton incidente e do número atômico Z da amostra (coeficiente de atenuação $\alpha_{\text{fotoelétrico}} \propto Z^4/E^3$), o espalhamento Compton depende basicamente da densidade eletrônica da amostra. Nas faixas de energia tipicamente usadas em aplicações em material ósseo o efeito fotoelétrico é prevalente (até ~ 50 keV) e é responsável pela maior parte da atenuação do feixe na amostra, como pode ser observado na Figura 7, onde pode-se verificar que o coeficiente de atenuação em massa do osso é dominado pelo efeito fotoelétrico para fótons de energia de até 50 keV (MARTIN, 2007).

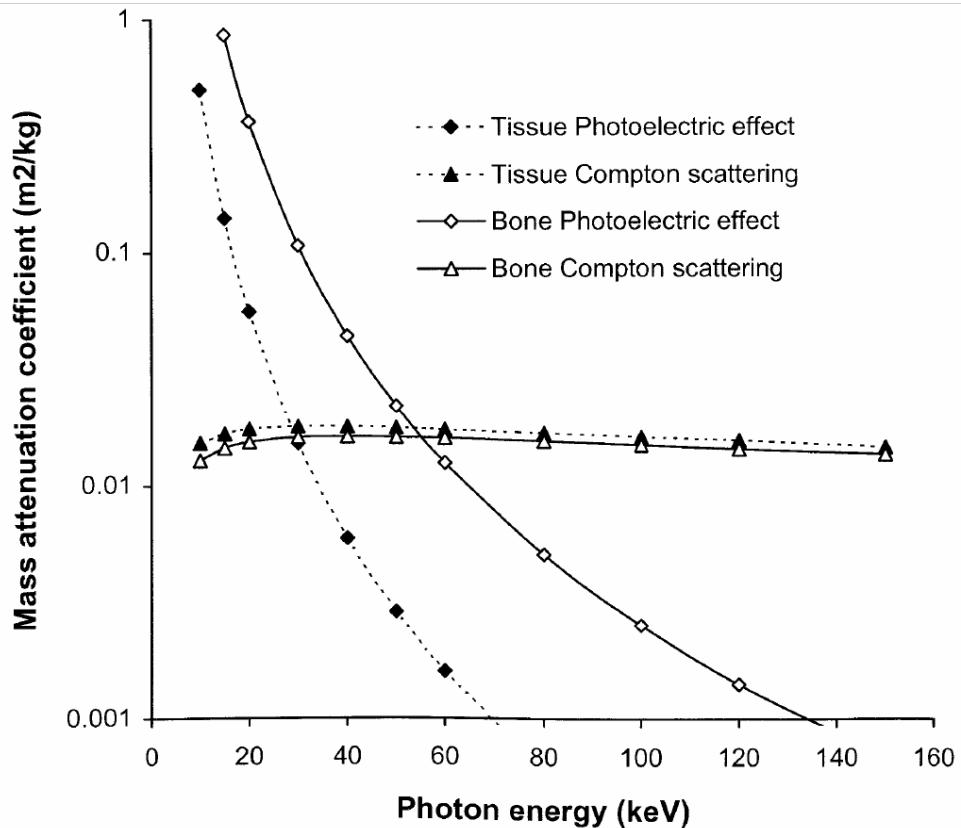


Figura 7: Relação entre efeito fotoelétrico e espalhamento Compton com o coeficiente de atenuação em massa e energia do fóton incidente, na interação dos raios X com a matéria orgânica (tecido ósseo e mole). Adaptado de MARTIN, 2007.

Um feixe de raios X é atenuado ao interagir com uma amostra, perdendo intensidade. Esta perda de intensidade é descrita pela lei de Beer-Lambert:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-(\mu\delta)} \quad (3.1)$$

onde a razão entre a intensidade do feixe paralelo monoenergético após e antes (I/I_0) de sofrer atenuação linear ao incidir na amostra é dada pela exponencial negativa do produto entre o coeficiente de atenuação linear da amostra, μ , e a espessura percorrida δ . No entanto, em um caso real o coeficiente de atenuação varia espacialmente ao longo da amostra, e não pode ser considerado constante, sendo então uma função da posição, $\mu(\delta)$, e a intensidade do feixe após percorrer um comprimento s é dada por

$$I_{(s)} = I_0 e^{-\int_0^s \mu(\delta) d\delta}, \quad (3.2)$$

levando-se em consideração as variações espaciais do coeficiente na amostra. Por outro lado, o feixe de raios X não é constituído por fótons com uma única energia, mas sim por uma distribuição contínua. Considerando isto, bem como a dependência do coeficiente de atenuação da energia do fóton incidente, temos

$$I_{(s)} = \int_0^{E_{\max}} I_0(E) e^{-\int_0^s \mu(E, \delta) d\delta} dE, \quad (3.3)$$

em que os limites de integração são dados pelo espectro do feixe. O problema a ser resolvido é, de maneira geral, o de obter a variação da intensidade do feixe em cada projeção adquirida pelo detector. Portanto, considerando um pixel do detector, a projeção medida pode ser escrita como

$$p = -\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \int_0^s \mu(\delta) d\delta. \quad (3.3)$$

Vale lembrar que o coeficiente de atenuação μ é dado pela soma dos coeficientes de espalhamento e de absorção, relativos aos fenômenos discutidos anteriormente,

$$\mu = \mu_{esp} + \mu_{abs}, \quad (3.4)$$

e se relaciona com a densidade de massa, ρ , pela equação

$$\mu = \frac{\rho N_A}{M} \cdot \sigma_{\text{átomo}} = n \cdot \sigma_{\text{átomo}}, \quad (3.5)$$

sendo N_A , M e $\sigma_{\text{átomo}}$ a constante de Avogadro, a massa molar e a seção de choque total da interação entre fóton e o átomo presente na amostra, respectivamente. A razão entre o coeficiente de atenuação linear e a densidade (μ/ρ) é definida como o coeficiente de atenuação de massa. No caso de uma amostra composta por diferentes materiais, o coeficiente linear pode ser reescrito como uma média ponderada, em que se considera as diferentes densidades presentes na mistura,

$$\mu_{mis} = \sum (\mu/\rho)_i \cdot \rho_i. \quad (3.6)$$

Na prática, são diversos os fatores que contribuem para a perda de intensidade do feixe de raios X transmitidos em um ensaio tomográfico. A Figura 8 ilustra os mecanismos

gerais de atenuação, tanto relativo ao feixe, dado pelo seu comprimento de onda ou energia ($E_{fóton} \propto 1/\lambda_{fóton}$), bem como propriedades da amostra, como número atômico dos átomos que a compõem, a densidade de massa e a espessura percorrida pelo feixe na geração das projeções.

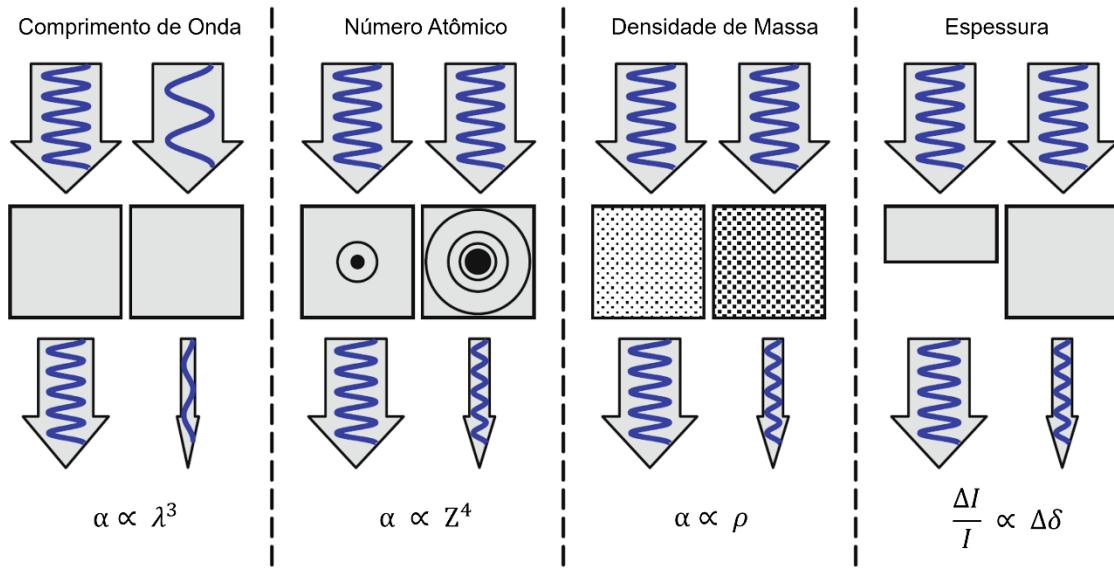


Figura 8: Diferentes causas de atenuação de um feixe de raios X. Comprimento de onda do feixe incidente, e número atômico, densidade de massa e espessura da amostra. Largura da seta de saída representa intensidade do feixe transmitido (adaptado de BUZUG, 2008).

3.6.2 A Fonte de Raios X

Os equipamentos de microCT convencionais contam majoritariamente com um tubo de raios X, onde o feixe é gerado por elétrons que, ao serem termicamente ejetados de um filamento aquecido, são acelerados por um campo elétrico em direção a um anodo. Da interação entre os elétrons e o anodo resulta a radiação de frenagem (*bremsstrahlung*), formando um feixe de raios X com distribuição contínua de energia. A Figura 9 apresenta espectros de raios X gerados por um tubo de um equipamento de microCT (v|tome|x m 300) com energia máxima de 60 keV, analisados por (ROMBERG JR. *et al.*, 2021).

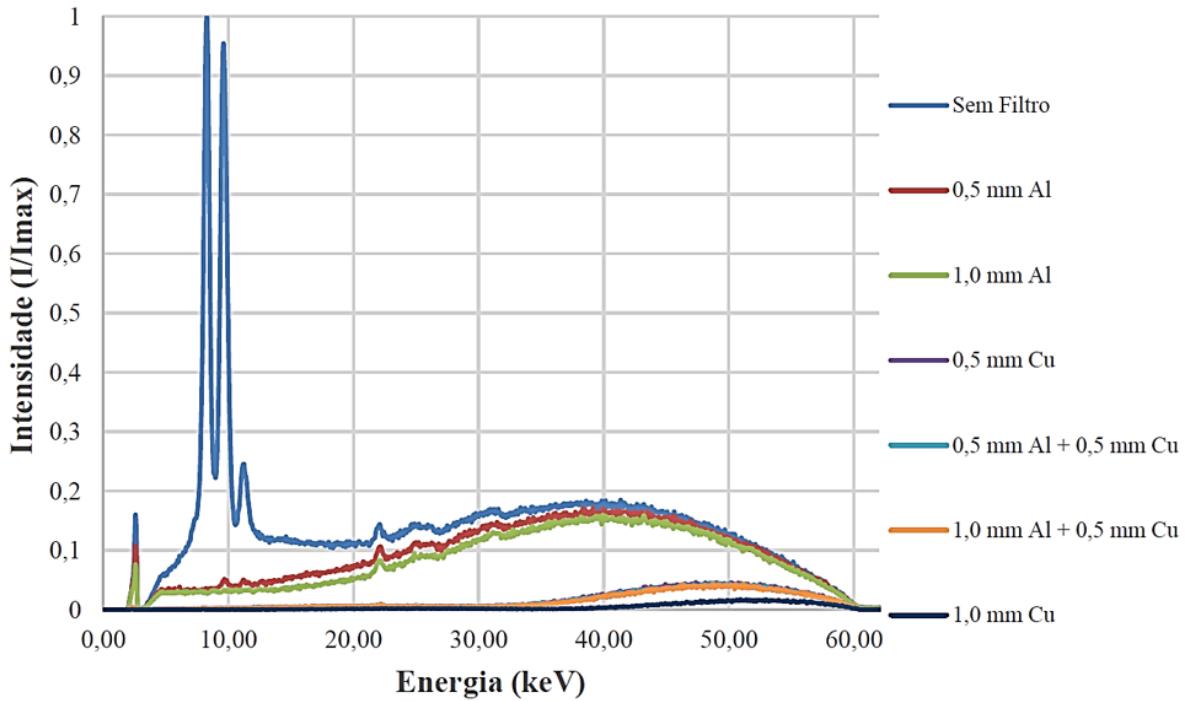


Figura 9: Espectros do feixe de raios X de um microtomógrafo convencional ($v/tome/x m 300$), configurado para tensão máxima do tubo de raios X de 60 kV, sem filtros (azul) e na presença de filtros de Al e Cu comumente usados na literatura. Adaptado de ROMBERG JR. *et al.*, 2021.

O espectro não filtrado possui picos característicos de tungstênio próximos a 10 keV (azul em Fig. 9), que é o material que compõe o anodo. O espectro na presença dos filtros de alumínio, por outro lado, apresenta menor intensidade para fótons de baixa energia, aumentando a energia média do feixe, dado que, como mencionado anteriormente, fótons menos energéticos tendem a ser mais absorvidos do que aqueles mais energéticos. Assim, a utilização destes filtros metálicos reduz a presença de artefatos de endurecimento do feixe (*beam hardening*) na imagem reconstruída (BUZUG, 2008).

O feixe produzido por uma fonte síncrotron, por outro lado, possui reduzido efeito de endurecimento de feixe, com um espectro com variação muito menor em energia (Figura 10), e com intensidade de duas ou mais ordens de grandeza maior do que as de tubos de equipamentos de laboratório. O fluxo, medido em fótons por segundo, do tubo que gerou os espectros da Fig. 9, por exemplo, é da ordem de 10^8 - 10^9 (SEARS *et al.*, 2016), enquanto na linha UVX, onde foram medidas as amostras deste trabalho, é da ordem de 10^{10} - 10^{11} , como observado na Fig. 10.

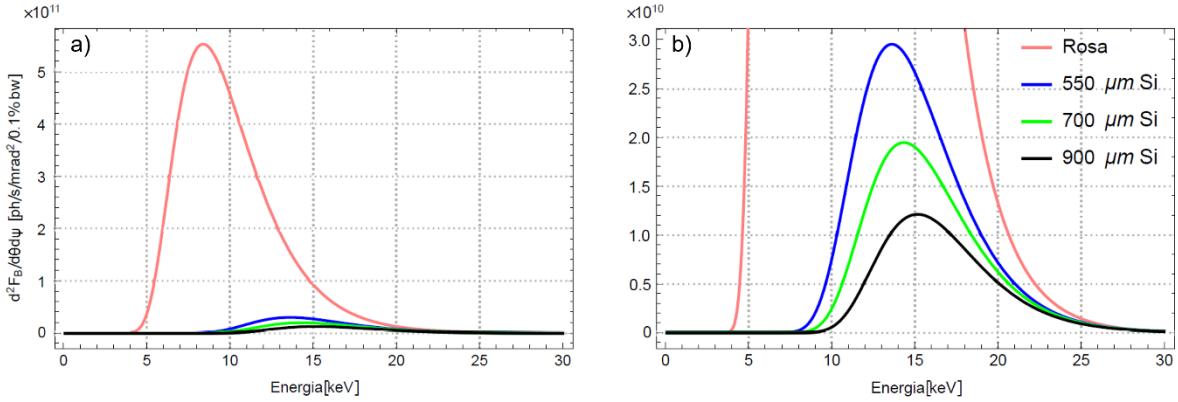


Figura 10: Espectros do feixe de raios X pela fonte sincrotron UVX, no CNPEM, mostrando o fluxo do feixe não filtrado e na presença de filtros de Si de diferentes espessuras. Fonte: MARTINEZ-ZELAYA, 2018.

3.6.3 Reconstrução

À aquisição das projeções, sucede-se o processo de reconstrução da imagem, no qual o produto é uma imagem digital 3D que representa o objeto real, previamente escaneado. A importância da obtenção desta imagem reside principalmente no fato de que é possível, na representação digital da amostra, a análise da sua morfologia interna, possibilitando, inclusive, a quantificação de diversos parâmetros de interesse científico, além da preservação digital do objeto em acervo digital (KEKLIKOGLOU *et al.*, 2019).

A reconstrução se dá através de operações matemáticas complexas, sendo usados algoritmos desenvolvidos especificamente para este propósito, cujas classificações refletem o modelo matemático utilizado, e podem ser divididos em três categorias: iterativos, analíticos e aqueles com base em inteligência artificial baseada em dados ou aprendizado (STOCK, 2019). A reconstrução é um problema de solução inversa, onde se deseja recuperar a informação original a partir de projeções.

O problema foi matematicamente resolvido por Radon em 1917, como mencionado anteriormente. Na prática, no entanto, é preciso introduzir fatores como a limitação de aquisições (no formalismo original de Radon, tomam-se infinitas projeções), bem como particularidades e imperfeições da fonte de raios X, geometria do feixe e sistemas de detecção. Neste sentido, diversos algoritmos foram desenvolvidos para otimizar a

reconstrução de imagens e, dentre os mais utilizados em aplicações de microCT estão os baseados no método de Retroprojeção Filtrada, ou *Filtered Back Projection* (FBP), sendo empregado tanto em softwares de reconstrução de microCT de bancada, como no caso do Skyscan (*NRecon*), como na aplicação por fonte síncrotron (sistema RAFT, MARTINEZ Jr. *et al.*, 2017), ambos sistemas empregados neste trabalho. Em 1984, (FELDKAMP *et al.*, 1984) desenvolveram, a partir da transformada de Radon (RADON, 1917) e do Teorema da Fatia de Fourier, um algoritmo para reconstrução de imagens tomográficas obtidas através de um feixe cônico, o Feldkamp-Davis-Kress (FDK), e todos os algoritmos do tipo FBP desenvolvidos posteriormente partem desta base (VÁSÁRHELYI *et al.*, 2020).

O desenvolvimento matemático no qual consiste o processamento realizado por FBP é denso e bem conhecido na literatura (BUZUG, 2008). Por outro lado, a ideia básica por trás do FBP é intuitiva e relativamente simples de entender. Tomando como amostra um objeto de geometria simples, como na Figura 11-a, em que um feixe paralelo de raios X incide sobre ela, temos que um perfil de atenuação é registrado no detector, cuja amplitude é proporcional à absorção do feixe transmitido pela amostra em cada ponto, gerando uma projeção relativa a um ângulo qualquer durante a rotação da amostra (Figura 11-a). Esta projeção é, então, retroprojetada na imagem, e distribuída uniformemente em todos os pixels no caminho dos raios X, como ilustrado na Figura 11-b,d. Este processo é repetido, realizando aquisições em ângulos diferentes enquanto a amostra é rotacionada em 180 ° (Figura 11:d-g), sempre somando as retroprojeções à imagem. Notoriamente, quanto menor o passo angular (e consequentemente maior o número de projeções), maior são as informações para a reconstrução da imagem digital da amostra, portanto maiores as chances de esta conter informações que melhor representam a amostra real, como pode ser observado comparando as imagens geradas a partir da soma de 1, 2, 3, 4 e 32 retroprojeções na sequência de imagens Figura 11:d-g. (WILLMOTT, 2019, GONZALEZ e WOODS, 2018, SCHOFIELD *et al.*, 2020).

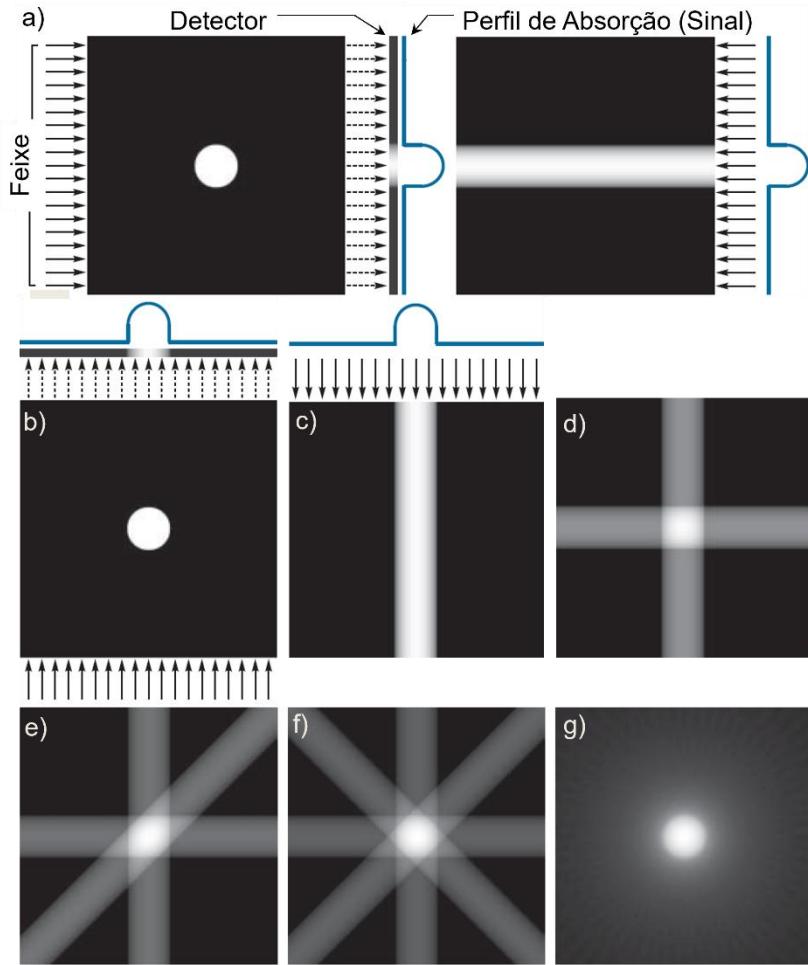


Figura 11: Retroprojeção Simples. a) Um feixe paralelo de raios X incide sobre uma amostra circular, o feixe transmitido é registrado em um detector, que gera um perfil de absorção do sinal unidimensional recebido. b) Retroprojeção do perfil detectado. c,d) Mesmo processo, com a amostra rotacionada em 90°. A reconstrução da imagem digital a partir da soma das duas retroprojeções anteriores gera e) uma imagem onde é possível identificar um objeto central, mais denso, ao centro, cuja forma é aprimorada sucessivamente com f) a soma de 3, g) 4 e h) 32 retroprojeções. Adaptado de BUZUG, 2008.

A Figura 11-h representa uma reconstrução utilizando o método de Retroprojeção Simples, onde podemos observar, além da imagem que representa a amostra, artefatos na imagem que aparecem como borrões (*blurring*), derivados da superposição de retroprojeções adjacentes, que também pode ser observado na Figura 12-a. O FBP aprimora a qualidade da imagem reconstruída ao introduzir uma etapa de filtragem após a aquisição dos dados de projeção (Figura 12-c). Nessa etapa, um filtro de frequência espacial é aplicado aos perfis de

atenuação, enfatizando os componentes de alta frequência e suprimindo os componentes de baixa frequência presentes nos dados de projeção. A diferença entre os resultados dos métodos pode ser observada na Figura 12, realizada a partir de um Phantom digital quadrado, notando especialmente as vistas topológicas das reconstruções obtidas por ambos métodos (Figura 12-b,d)

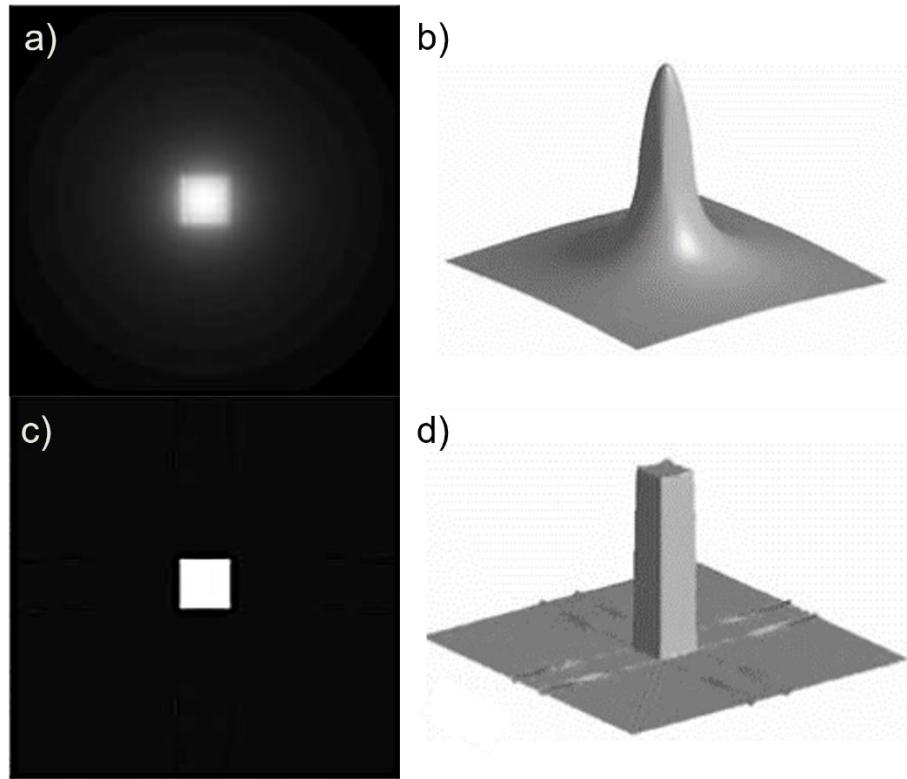


Figura 12: Utilizando uma amostra quadrada, é observada a reconstrução e imagem de sua topologia 3D realizadas a partir do método de a,b) Retroprojeção Simples e c,d) FBP, respectivamente. Adaptado de BUZUG, 2008.

3.6.4 A Imagem Digital

As imagens digitais são matrizes de pixels (2D) ou voxels (3D), cujos níveis de cinza assumem valores inteiros no intervalo $[0,255]$, no caso de imagens 8-bit, ou $[0,65535]$ em imagens 16-bit. Os níveis de cinza dos voxels, como discutido anteriormente, são dados pela absorção de raios X naquela dada região da amostra, e o contraste reflete as diferenças de densidade dos materiais presentes na amostra. Assim, é possível diferenciar materiais a partir do nível de cinza que apresentam na reconstrução, como ilustrado na Figura 13, onde pode-

se verificar o perfil de linha, ou seja, como os níveis de cinza dos pixels variam ao longo da linha traçada (*Plot Profile*, no Fiji). A Figura 13-a representa um corte transversal de uma amostra de tíbia de rato, contendo biomaterial (CHA) implantado há 12 semanas. A Figura 13-b apresenta a variação dos níveis de cinza (*Gray Value*, GV) dos pixels ao longo da linha traçada na Figura 13-a, onde é possível identificar, a partir das diferenças entre os valores, as regiões onde se encontram os diferentes materiais escaneados, sendo, neste caso, em ordem crescente da densidade observada (e respectivos valores de GV): *background* (ar, GV < 3), resina (~ 18-25), osso novo (~ 108-115), cortical maduro (~120-137) e biomaterial (~ GV > 140).

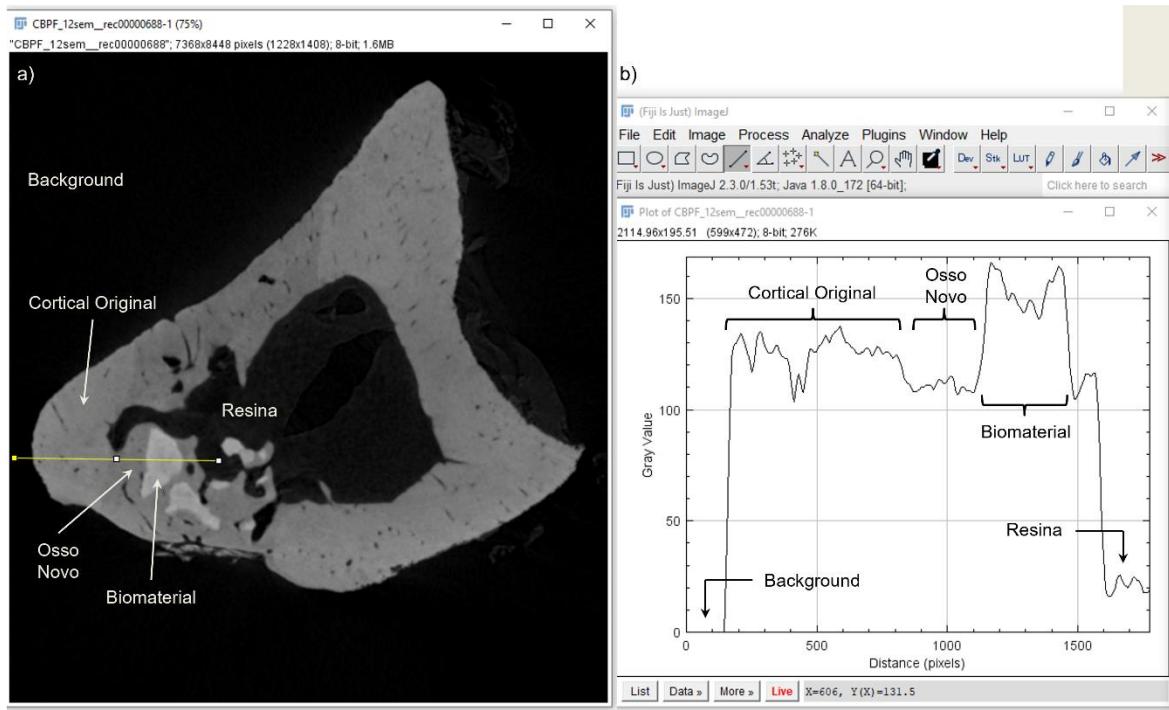


Figura 13: No software Fiji, a reconstrução de uma microtomografia de um corte transversal de uma tíbia de rato contendo biomaterial (CHA) implantado há 12 semanas, em níveis de cinza. a) Linha traçada para o perfil de linha (amarelo), percorrendo as regiões da imagem contendo (em ordem crescente de densidade): *background*, resina, osso novo, cortical maduro e biomaterial. b) Perfil de linha apresentado como função dos níveis de cinza dos pixels percorridos.

As imagens digitalmente reconstruídas possibilitam, além da inspeção visual das estruturas internas da amostra, a quantificação de diversos parâmetros relativos à morfologia dos materiais contidos no objeto escaneado. Mais especificamente, no caso das amostras analisadas neste trabalho, que consistem em amostras ósseas tais como a disposta na Figura

13, é também possível analisar a rede trabecular quanto à sua forma e arquitetura. Tais análises requerem tratamentos de imagem mais avançados e específicos, que serão discutidos no próximo capítulo.

4. Materiais e Métodos

4.1 Biomateriais

Os biomateriais utilizados neste trabalho são três compósitos diferentes, que consistem em uma mistura do polímero alginato de sódio e pós nanoestruturados de hidroxiapatita (HA), hidroxiapatita carbonatada (CHA) e CHA com adição de estrôncio (SrCHA). Os biomateriais foram produzidos no Laboratório de Biomateriais, no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

4.1.1 Síntese dos pós de HA, CHA e SrCHA

Os pós foram sintetizados por método de precipitação por via úmida, com teor teórico de 6% em peso de CO_3 , 5% em peso de estrôncio (no caso da SrCHA), e razão Ca/P entre 1,6 e 2,0. A partir de uma solução de 0,2 M de nitrato de cálcio $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$, é adicionada solução aquosa de 0,12 M de fosfato de amônio dibásico $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$, contendo 0,0012 M de carbonato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3]$. Uma taxa de adição de reagentes de 30 ml/min, com agitação mecânica de 240 rpm, com tempo de digestão de 180 minutos em $\text{pH}=9$. A síntese da SrCHA 3% seguiu o mesmo protocolo, sendo a solução, aonde foram adicionados o $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e o $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, composta por 0,1990M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,0098 M de nitrato de estrôncio $[\text{Sr}(\text{NO}_3)_2]$. Em seguida, os precipitados sólidos sintetizados foram filtrados e lavados com água deionizada (MilliQ Millipore Corporation) até a neutralização do pH, em $\text{pH}=7$. Os materiais foram então secos por liofilização, e separados pela faixa de granulometria $< 75 \mu\text{m}$, tendo sido usadas peneiras de aço inox para evitar contaminação. A SrCHA foi sintetizada à 37 °C, e a CHA a 5 °C. A HA foi sintetizada a 90 °C, e sinterizada a 1000 °C. Os materiais na forma de pó foram então embalados em frascos de polipropileno devidamente esterilizado, e estocados em dessecadores com temperatura e umidade controladas.

4.1.2 Confecção das microesferas

Após o preparo dos pós contendo as nanopartículas, é necessário processar os pós na forma de microesferas. Para tal, foi preparada uma solução de alginato de sódio 1% em massa

do biopolímero (Sigma Aldrich/Fluka Biochemika, Buchs, Suíça) em água deionizada. Os diferentes pós foram adicionados à solução aquosa de 10 mg/ml alginato de sódio na respectiva proporção de alginato/apatita 1:15 em massa. Em seguida, a mistura foi agitada de modo a homogeneizá-la completamente, resultando em uma pasta cerâmica. Então, foi realizada a extrusão da mistura através de agulhas 24 G 1 ¾ (0,55 x 20 mm) (BD Precision Glide®, Curitiba, PR), previamente esterilizadas, seguido de gotejamento em uma solução de cloreto de cálcio 0,15 M (CaCl_2). A formação das esferas ocorre a partir da geleificação completa do alginato, após 24 horas em solução de cloreto de CaCl_2 em recipiente fechado. As microesferas foram então lavadas em água deionizada de modo a eliminar totalmente a solução salina. Finalmente, as microesferas foram levadas à estufa, durante 12 horas a 30 °C. Para a separação, foi utilizada faixa de granulometria em peneiras de aço inox entre 425 μm a 600 μm , e embaladas em recipientes de polipropileno. Por fim, os materiais foram esterilizados no Laboratório de Instrumentação Nuclear, no Programa de Engenharia Nuclear da COPPE/UFRJ, por radiação gama (Irradiador de Cobalto 60), com dose total aplicada de 15 kGy nas amostras, taxa de dose de 19,72 Gy/min, e tempo total de irradiação de 760 minutos, tendo sido estocados em dessecador com temperatura e umidade controlados.

A citocompatibilidade e biocompatibilidade dos materiais foram verificadas em trabalhos anteriores (VALIENSE *et al.*, 2015; KAMMER *et al.*, 2016; Barros *et al.*, 2012) tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em diferentes modelos (e.g. implante subcutâneo, tibia, ensaio histológico, calvária). O grupo de amostras selecionadas constitui, portanto, um conjunto ideal de amostras para entender se e como a fragmentação do biomaterial, composto por microesferas do polímero alginato contendo nanopartículas de fosfato de cálcio, afeta a arquitetura e estrutura da rede de trabéculas formadas no reparo ósseo. Ademais, maiores detalhes sobre o método de síntese dos pós de hidroxiapatita e a confecção das esferas pode ser encontrado em (SARTORETTO, 2018 e MARTINEZ-ZELAYA, 2019).

4.1.3 Modelo *in vivo*

O modelo *in vivo* consistiu no defeito não crítico em tibia de ratos (Wistar). Neste modelo, é feita uma abertura circular de 2 mm de diâmetro na região da diáfise, utilizando uma broca cirúrgica. A implantação dos biomateriais foi realizada pelo grupo do

Departamento de Cirurgia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense. O tempo experimental foi de 21 dias, um período no qual o crescimento ósseo na região do defeito ainda se dá na forma trabecular, possibilitando a análise da arquitetura trabecular formada na presença dos biomateriais (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021). Decorrido o período de 21 dias após os implantes, os animais foram eutanasiados, e suas tíbias fixadas e incluídas em resina. Detalhes sobre os procedimentos cirúrgicos utilizados na implantação, eutanásia, coleta das amostras, bem como a fixação destas em resina e ética no manejo dos animais podem ser encontrados em (SARTORETTO, 2018 e MARTINEZ-ZELAYA, 2019).

4.2 Técnicas Experimentais

De modo a caracterizar o osso novo na presença do biomaterial, foram realizadas as técnicas de microCT (convencional e por SR-microCT) e FIB-SEM. Nesta seção são descritos os equipamentos utilizados e seus respectivos parâmetros e métodos de análise dos dados.

4.2.1 MicroCT

A microtomografia é uma técnica com setup versátil, que compreende diferentes aparelhos experimentais em suas aplicações, dependendo do que se deseja observar. Neste trabalho, a fim de avaliar a fragmentação do biomaterial, se faz necessária o uso da SR-microCT, especialmente no caso em que há alta fragmentação (SrCHA), onde uma parte considerável dos fragmentos é menor do que é possível quantificar por microCT convencional (fragmentos da ordem de micrômetros, por exemplo). Por outro lado, a microCT convencional possui a vantagem de ser relativamente mais acessível, assim questões científicas que podem ser resolvidas por análises com imagens de tamanho de pixel da ordem de 5 μm podem se beneficiar de microtomógrafos de bancada.

4.2.1.1 SR-microCT (IMX)

As aquisições das amostras foram realizadas na linha de luz de microCT (IMX), no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). As amostras foram posicionadas entre o detector e a saída do feixe policromático de raios X, com energia dos fótons entre 4-24 keV. De modo a possibilitar a visualização de detalhes não observados no modo de transmissão, as medidas foram realizadas em modo de contraste de fase. Para cada amostra analisada, foram adquiridas 2048 projeções, com rotação completa das amostras (360°). Filtro de Si de 950 μm foram usados para minimizar os efeitos de endurecimento do feixe (*beam hardening*).

A reconstrução das imagens foi realizada com o software RAFT, do LNLS, e o software FIJI (ImageJ) para recortar a região de interesse e reduzir o tamanho dos dados. As imagens reconstruídas têm voxel isométrico com tamanho de $(0.82 \mu\text{m})^3$, e dimensão de 2048 x 2048 x 2048.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura de duplo feixe (FIB-SEM)

O material obtido foi montado em um suporte para FIB-SEM utilizando cola de prata, sendo posteriormente depositada uma camada de 1 μm de ouro sobre a superfície da amostra. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura de duplo-feixe Lyra3 (Tescan). Inicialmente, foi utilizado um feixe de gálio, com uma corrente de 10 nA, para desbastar a superfície do bloco até produzir uma região em forma de “U” a partir da qual foi exposta a região que seria utilizada para a obtenção das imagens. Utilizando a função *slice and view*, a resina do bloco foi desbastada com o feixe de Ga+ (em um ângulo de 55° em relação ao feixe de elétrons), utilizando uma corrente de 1 nA. Entre um corte e outro, a superfície do bloco foi visualizada com o feixe de elétrons, sendo obtida uma imagem a uma voltagem de 10 kV, no modo de detecção de elétrons retroespalhados, com cortes de 50 nm e tamanho de pixel de 15 nm.

4.3 Processamento

O processamento e análise das imagens tomográficas foi realizado de forma distinta para as imagens adquiridas por SR-microCT e as oriundas do tomógrafo de bancada. Nesta seção são discutidos ambos os processos.

4.3.1 SR-microCT

A metodologia empregada no processamento e análise das imagens de SR-microCT seguiu uma série de processos, passando pelo uso de diversos softwares, de modo a aproveitar o melhor de cada um de maneira eficiente. O Fluxograma abaixo ilustra as diferentes etapas deste processo.

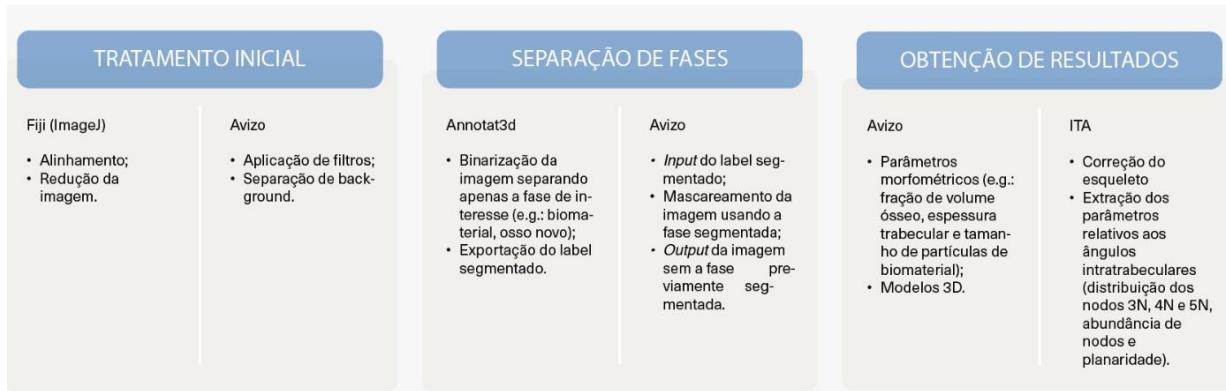


Figura 14: Fluxograma da metodologia de análise das imagens de SR- μ CT.

As imagens obtidas por SR-microCT possuem um tamanho de pixel significativamente menor ($0.82 \mu\text{m}$, no caso das amostras deste trabalho) e tamanho da imagem maior ($\sim 3000 \times 3000 \times 2000$) do que as produzidas pela microCT convencional, o que implica em maior custo computacional tanto na renderização quanto para as quantificações. Por esta razão, se faz necessária uma etapa inicial de processamento, anterior à segmentação, onde a imagem reconstruída possa ter suas dimensões reduzidas. Nesse sentido, portanto, a imagem reconstruída é levada ao software Fiji (ImageJ), onde pode ser reduzida (função *crop*) de modo que, ao fim desta etapa, reste a menor imagem possível que contém a amostra. Ao realizar este processo no caso da amostra SrCHA, por exemplo, suas dimensões foram reduzidas de $3318 \times 3318 \times 2048$ para $2838 \times 2928 \times 2048$ (de $\sim 22 \text{ GB}$ para $\sim 16 \text{ GB}$, respectivamente).

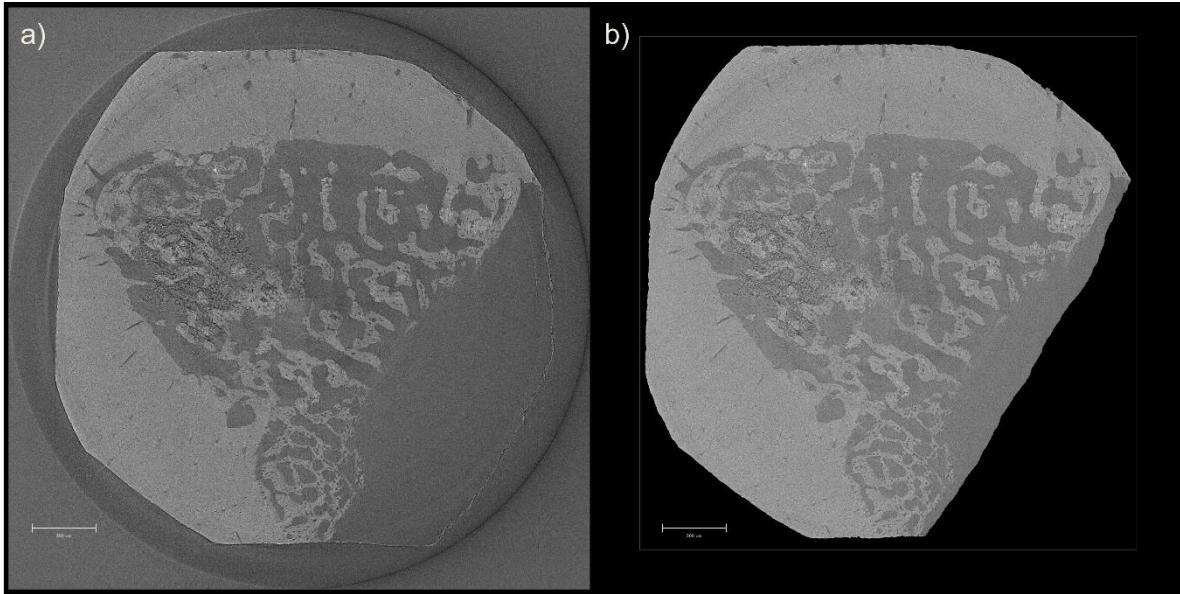


Figura 15: Imagem da SrCHA, a) original e b) após o crop e remoção de background.

O volume recortado é então aberto no Avizo, onde a imagem será filtrada. Imagens tomográficas, especialmente as adquiridas por SR-microCT, costumeiramente possuem artefatos de imagem que impossibilitam que a segmentação seja realizada apenas por seleção de um limiar (*threshold*) no histograma de níveis de cinza de determinada imagem. Faz-se necessário, portanto, o uso de filtros que eliminem ou suavizem tais artefatos. Como filtros alteram a imagem, é fundamental atentar para sua utilização de modo que não sejam perdidas informações relevantes contidas na imagem, algo que varia de caso para caso, como será descrito ao longo dessa seção.

Inicialmente, deseja-se usar um filtro que suavize levemente a imagem, eliminando ruídos leves, mas sem causar borramento (*blurring*) de interfaces entre materiais diferentes na imagem. Para tal, foi aplicado o filtro *Non-Local Means* (Buades e Morel, 2005). Amplamente usado no tratamento de imagens, este filtro é capaz de eliminar ruído enquanto preserva bordas (Figura 16). Em sua suavização, o peso é dado de acordo com a vizinhança dos pixels, onde pixels com vizinhanças semelhantes tem maior peso, e vizinhanças muito diferentes tem menor peso na suavização.

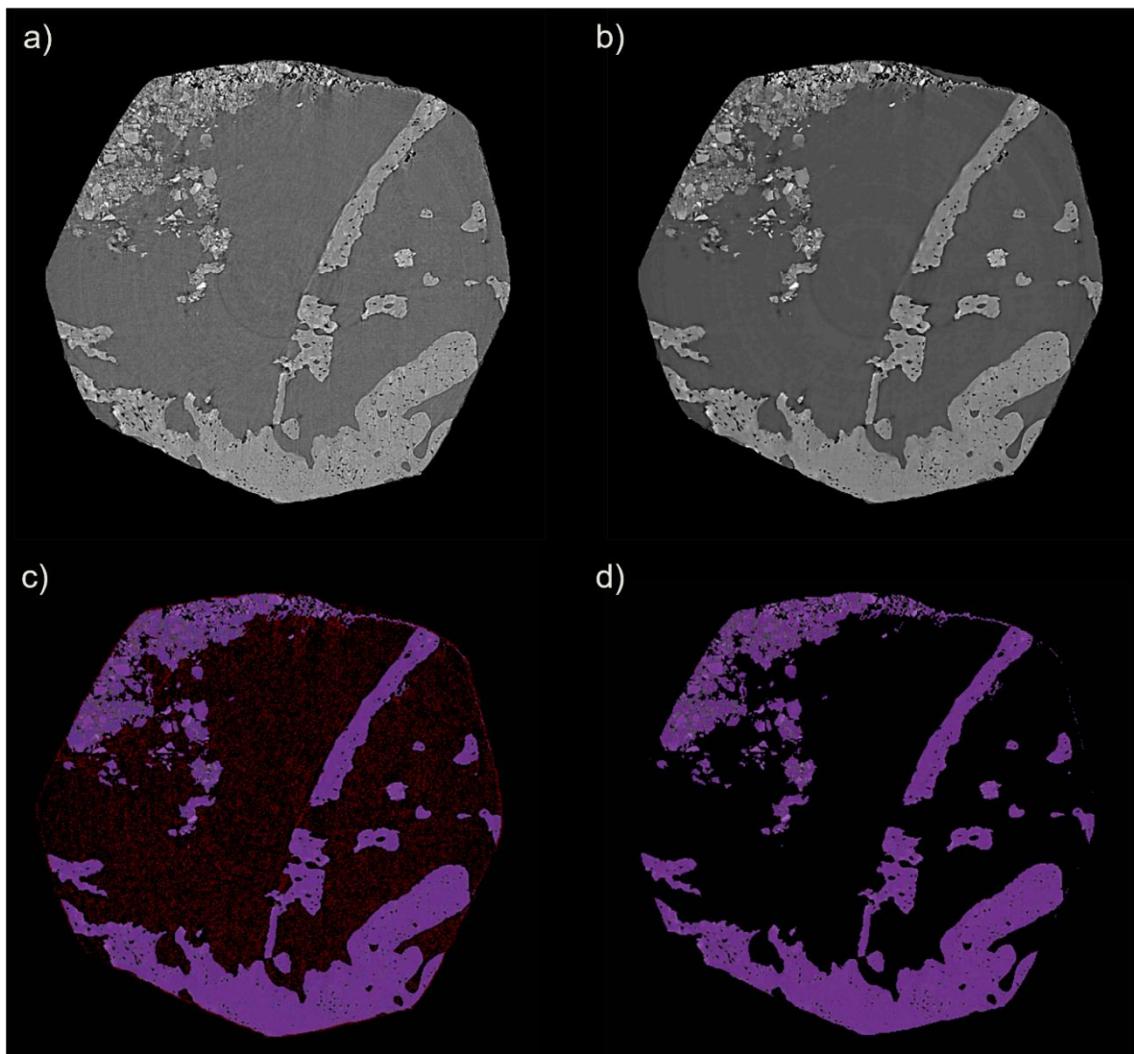


Figura 16: Filtro de um corte da CHA, a) original e b) filtrada pelo Non-local Means Filter. Imagem binarizada, por seleção de histograma, c) sem e d) com a aplicação do filtro. É possível notar que, na segmentação sem o filtro, diversos pixels associados à resina estão sendo erroneamente considerados, diferentemente da binarização após o uso do filtro.

Após o processo de filtragem, é realizada a separação do background da imagem, na qual é efetuada a binarização da mesma, de modo que a imagem seja dividida entre background (preto) e o resto da imagem (branco).

Sem background, é iniciada a separação de fases da imagem. Neste momento, a imagem contém apenas fases de interesse: osso maduro, osso novo, biomaterial e resina. Na binarização das imagens foi utilizado principalmente o software Annotat3D, desenvolvido pelo CNPEM. Na segmentação neste software, inicialmente o operador faz anotações em cortes (*slices*) da imagem, designando assim um *label* para cada fase da imagem. Apesar do

software permitir tentar a segmentação de todas as fases de uma só vez, de modo a otimizar este processo é aconselhável realizar a binarização de uma fase por vez. Isso é particularmente necessário em casos em que as diferenças entre as fases não são facilmente percebidas, como no caso das amostras deste trabalho. Assim, as anotações são feitas manualmente, atribuindo a um *label* conjuntos de pixels conforme ilustrado na Figura 17.

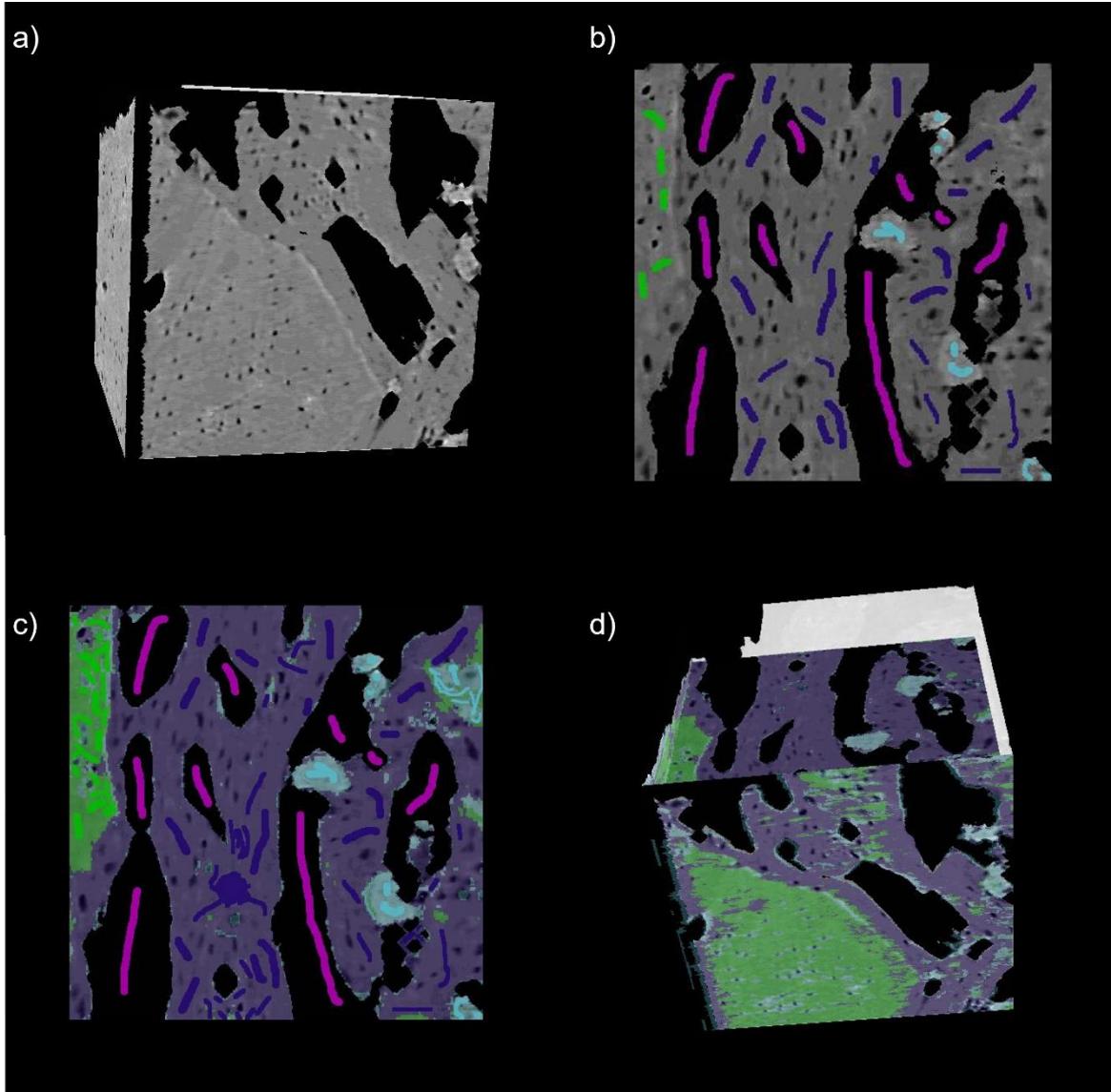


Figura 17: Segmentação no Annotat3D. A partir da a) imagem em níveis de cinza original, são realizadas b) anotações em cortes da amostra ao longo do volume. Ao computar as anotações, o algoritmo pode generalizar as escolhas tanto para c) um corte, quanto para d) todo o volume, resultando em uma imagem segmentada com as fases designadas.

No menu *Classification*, são selecionados diversos parâmetros de modo a otimizar a performance do programa. Inicialmente, são selecionados os filtros que serão aplicados na imagem de modo a facilitar o processo de separação da fase desejada por parte do algoritmo, bem como sua janela de filtragem e peso na imagem (neste caso, foi usada a configuração padrão, como na Figura 18). O programa trabalha com superpixels, que são agrupamentos de pixels próximos que compartilham certa semelhança (níveis de cinza dentro de um mesmo intervalo, por exemplo), o que otimiza o processamento de imagens reduzindo o custo operacional e consequente tempo necessário para realizar suas operações (GONZALEZ e WOODS, 2018). Assim, são também selecionados o grau de espaçamento e compactação dos superpixels (*Spacing* e *Compactness*, respectivamente). O primeiro define o tamanho de um superpixel, em pixels (neste caso, 3), enquanto o segundo determina quão regular serão os superpixels, onde números maiores levam a superpixels mais regulares e com menor informação de borda (tendendo ao quadrado). Nas imagens usadas neste trabalho, a compactação foi definida em 100. A seguir, é selecionado o classificador. O software permite a seleção de um classificador, dentre várias opções de algoritmos. O classificador que apresentou melhor desempenho foi o *Random Forest* (com número de sementes igual a 1000), tendo sido usado em todas as imagens. Este classificador consiste na técnica chamada de "Random Forest", que é um método de conjunto que utiliza várias árvores de decisão aleatórias para classificar dados de treinamento em diferentes categorias. Essa abordagem é utilizada para aumentar a precisão preditiva do algoritmo e reduzir o excesso de ajuste, que ocorre quando o modelo é excessivamente ajustado aos dados de treinamento e perde sua capacidade de generalização para novos dados. Além disso, a técnica oferece uma vantagem em relação à eficiência computacional, com tempos de treinamento mais curtos e maior robustez na classificação. Finalmente, após o estabelecimento de todas estas etapas, o programa processa a imagem de acordo, realizando sua binarização, gerando um *label* associado à fase segmentada.

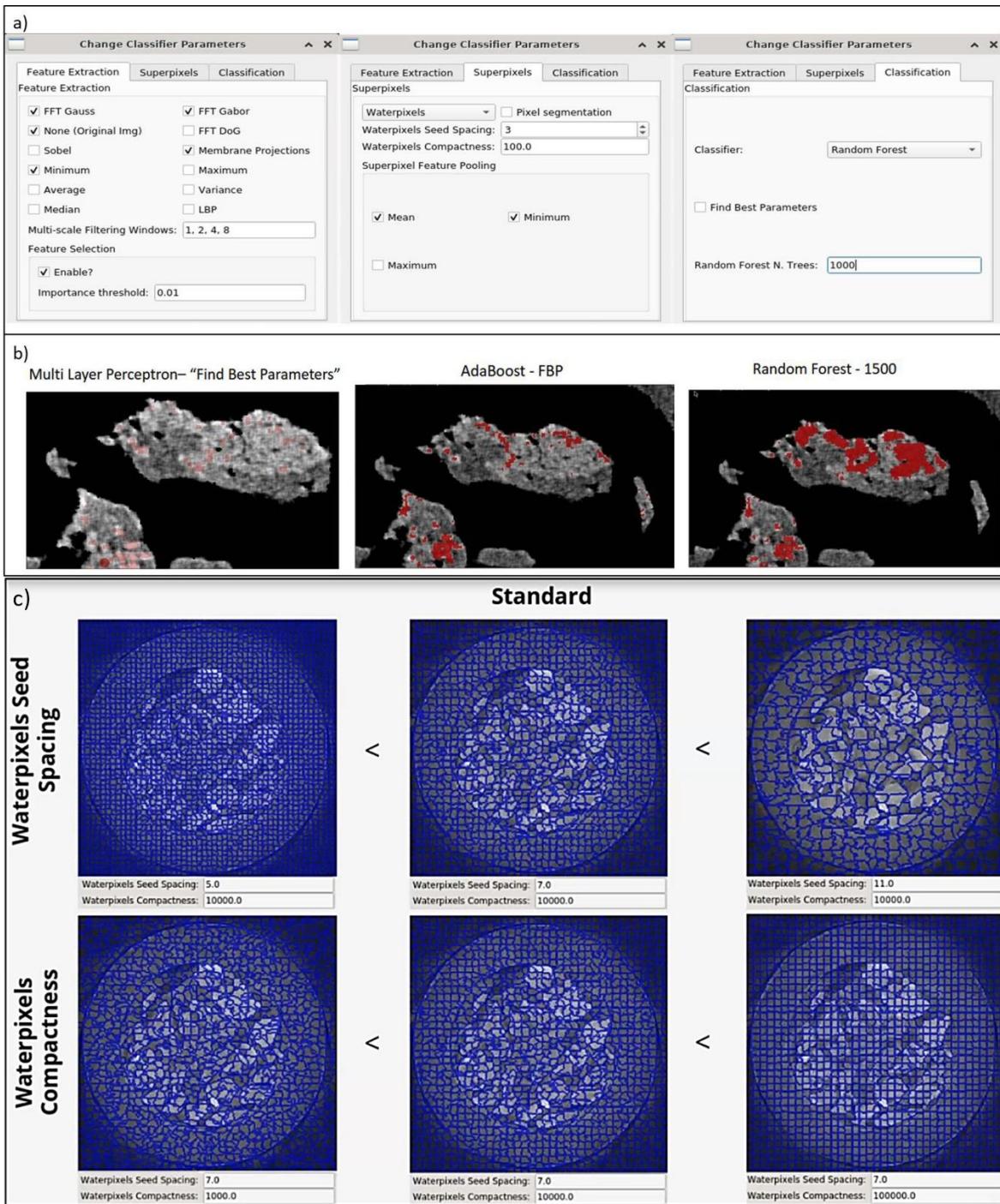


Figura 18: Seleção de classificadores no Annotat3D.

Este label é, então, exportado e aberto no Avizo, onde pode ser reparado (uma vez que comumente o label não sai perfeito do Annotat3D), e usado para mascarar a imagem, resultando em uma imagem com uma fase a menos (pixels que representam o label se tornam pretos, ou seja, $GV = 0$), e a imagem resultante é levada novamente ao Annotat3D para a

separação de outra fase. Este processo é repetido até que todas as fases estejam devidamente segmentadas. A ordem utilizada na separação foi: resina, osso maduro, biomaterial e osso novo.

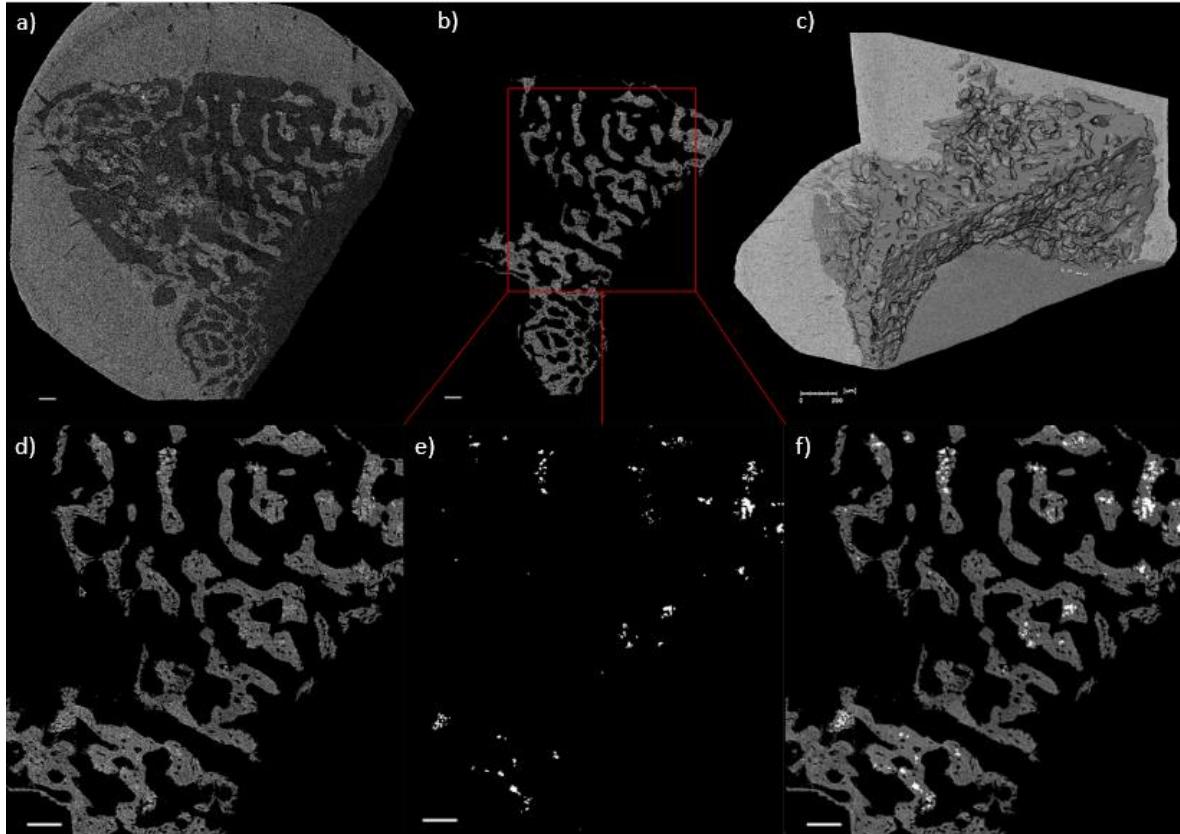


Figura 19: Diferentes etapas na segmentação da SrCHA. a) imagem original sem background, b) imagem apenas com as fases do osso trabecular e biomaterial, c) renderização do volume contendo trabéculas e biomaterial, d, e, f) corte expandido de b), com a amostra contendo a fase de osso e biomaterial antes da segmentação, apenas biomaterial segmentado, e osso trabecular com material segmentado, respectivamente. Escala: 200 μm .

4.4 Análises

A metodologia empregada nas análises das imagens é discutida nesta seção, em que estão descritos os processos utilizados para a obtenção dos parâmetros relacionados à arquitetura trabecular e àqueles empregados para obter os parâmetros morfométricos das amostras.

4.4.1 Arquitetura trabecular

A arquitetura trabecular foi caracterizada pelo uso combinado dos softwares Avizo e ITA app. No Avizo, o osso trabecular já devidamente binarizado e separado do cortical, é usado para a obtenção do esqueleto através do processo de esqueletização da imagem (*Skeletonization*). A esqueletização de uma imagem como a de uma região de osso trabecular consiste em um processo complexo, com uma sucessão de passos que devem ser cuidadosamente empregados de modo que, ao fim, seja obtido um esqueleto que efetivamente represente a arquitetura da imagem binarizada. Para evitar possíveis erros, é preciso inicialmente preparar a imagem especificamente para o processo de esqueletização. Este preparo consiste na eliminação de todos os poros das trabéculas e aplicação de filtros de suavização na imagem, o que reduz as chances de serem gerados segmentos além daqueles que são necessários para representar a rede trabecular. Caso contrário, um segmento da rede com um poro pode se bifurcar, por exemplo, ou, no caso da imagem não suavizada, o algoritmo pode interpretar uma variação relativamente brusca de espessura como um novo segmento. Importante salientar que o uso de funções de redução de ruído, como a de suavização, alteram a morfologia das trabéculas localmente, de modo que tais ferramentas devem ser usadas com cautela, avaliando seus efeitos na imagem. Particularmente, como a suavização tende a reduzir o diâmetro dos segmentos de uma imagem binarizada, o uso de um filtro muito pesado (de máscara com tamanho de pixels da ordem da espessura dos menores segmentos da imagem) pode levar à perda de segmentos da imagem. Após a realização da preparação da imagem, pode-se começar o processo efetivo de esqueletização.

Inicialmente, é aplicada a função *Distance Map*, que realiza o cálculo de um mapa de distância a partir de uma imagem binarizada. Este processo consiste em atribuir a cada voxel um valor igual ao valor da distância do voxel em questão até o voxel de borda mais próximo. A função permite que o usuário defina o raio máximo (em voxels) que um objeto pode ter para que a transformação de distância seja calculada corretamente. Esse mapa de distância é importante para guiar o processo de afinamento dos segmentos da imagem, que é a próxima etapa deste processo.



Figura 20: Etapas do processo de esqueletização no Avizo.

Com o mapa de distâncias, é então usada a função *Thinner* do Avizo, na qual os voxels dos segmentos são removidos de modo que cada segmento se torne uma linha de voxels (raio de um voxel) (Figura 21-b). Neste processo, são determinados os parâmetros *Branches Minimum Length*, que controla a sensibilidade (em voxels) para gerar Branch points (que definem um segmento do esqueleto); e *Max Iterations*, o número máximo de iterações que o algoritmo de afinamento realizará para estabelecer um segmento. Quanto maior, maior custo computacional. Finalmente, é realizada a suavização do esqueleto, através da ferramenta *Smooth Line Set*, onde as alterações em seus parâmetros podem diminuir o número de segmentos duplicados gerados no esqueleto, de modo que a imagem binarizada final

represente mais satisfatoriamente a rede trabecular da imagem original. O output deste processo é um arquivo do Avizo do tipo *Spatial-Graph*, que pode ser exportado como uma tabela, possibilitando seu uso em outros programas.

A tabela contendo as informações referentes ao esqueleto é, então, importada no ITA app (Figura 21-a) (REZNIKOV *et al.*, 2016). O programa possui um conjunto de parâmetros que devem ser inseridos como input, que variam de acordo com o dado analisado. O primeiro é o *Max Merge Edge*, que controla a fusão de nós quando o segmento que os conecta é suficientemente pequeno. Isso se faz necessário uma vez que o algoritmo de esqueletização pode gerar múltiplos nós falsos dentro do mesmo nó real no esqueleto (Figura 21-b). Para evitar que isso ocorra, é importante conhecer a espessura média das trabéculas da amostra, usando este valor (em voxels) para determinar o comprimento máximo que um segmento pode ter, sendo ele ainda muito pequeno para representar um segmento trabecular separado. Qualquer segmento com comprimento menor que esse valor será fundido em um único nó. Por exemplo, se a espessura trabecular média tem entre 40 e 41 voxels, recomenda-se fundir os pares de nós separados por menos de 40 voxels.

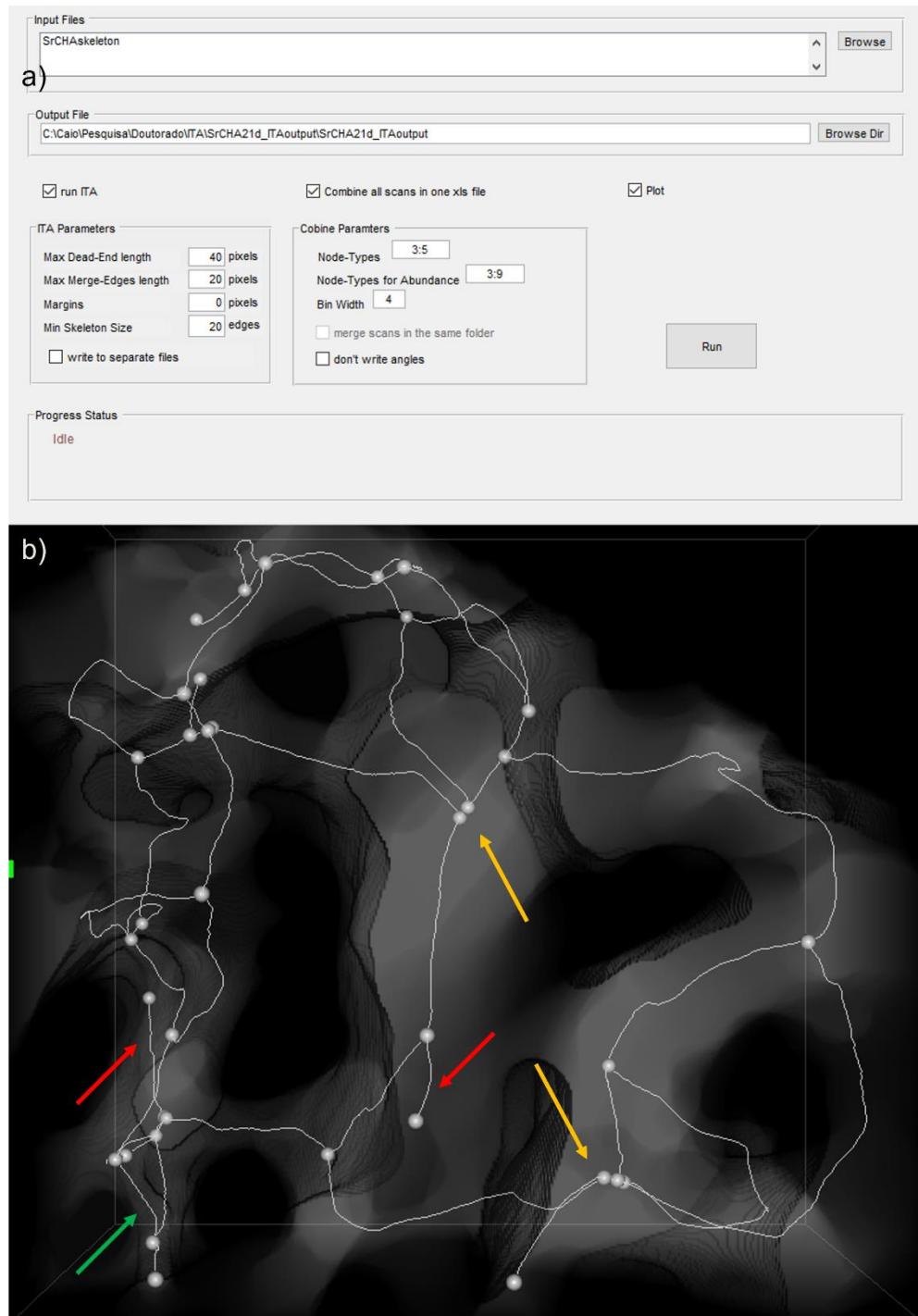


Figura 21: a) Interface do software ITA app (REZNIKOV, 2016). b) Subvolume esqueletizado, em que é possível ver erros na esqueletização realizada pelo Avizo, sendo as setas amarelas regiões de formação de um ou mais nós falsos, e as vermelhas indicam falsos segmentos.

O parâmetro *Margins* permite definir uma margem 3D ao redor da amostra que será excluída do cálculo ITA. Como é comum que a região de interesse que compreende a imagem analisada esteja contida em uma região trabecular, como no caso deste trabalho, é esperado que as bordas apresentem maiores dificuldades em representar a rede trabecular real nas regiões da imagem onde existem trabéculas na borda da imagem. Assim, faz-se necessário que se tome o comprimento médio do ramo trabecular (comprimento trabecular médio), calculado pelo Avizo, como base para definir a borda.

O parâmetro *Dead-Ends Threshold* determina o comprimento máximo para os segmentos que não possuem conexão em uma das extremidades. Segmentos deste tipo com comprimento acima do estabelecido, em voxels, são excluídos. Esta função tenta corrigir possíveis erros no processo de esqueletização anteriormente descrito, mais precisamente, elimina possíveis segmentos erroneamente gerados no meio do esqueleto. Por outro lado, excluir trabéculas desconectadas reais da amostra pode prejudicar significativamente os resultados – dado que isso alteraria artificialmente a categoria do nó ao qual estavam conectadas (e.g. um segmento eliminado de um nó do tipo 5N transforma o nó em um nó 4N). Portanto, é recomendado que o valor atribuído a este parâmetro não seja maior que o comprimento médio trabecular, em voxels (calculado pelo Avizo). Em *Node-Type* são definidos os nós que o algoritmo computará, sendo recomendável o cálculo dos nós compreendidos entre 3:5 na maioria dos casos. Finalmente, o parâmetro *Skeleton Size Threshold* permite o uso de mais de um esqueleto, o que não é o caso das amostras deste trabalho.

O software ITA app tem como saída as informações relativas aos nodos (3N, 4N e 5N), como abundância e distribuição angular dos segmentos que os formam, e a planaridade dos 3N, possibilitando a caracterização quantitativa da arquitetura trabecular.

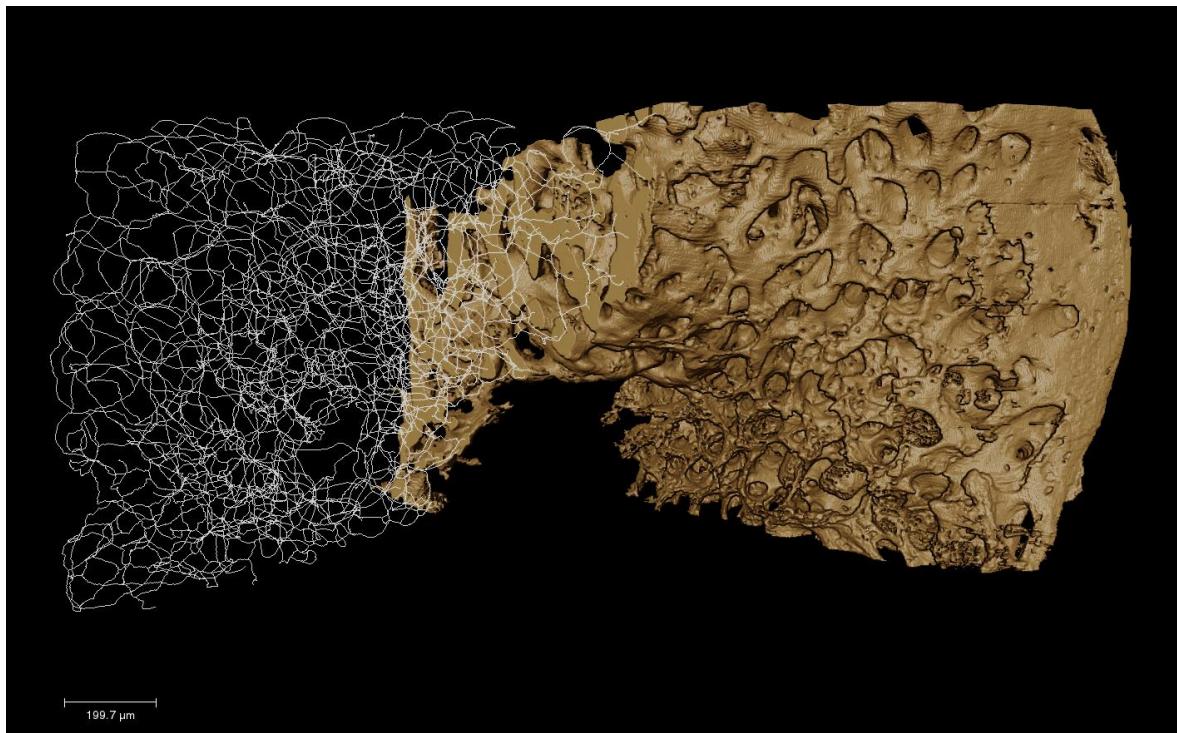


Figura 22: Modelo 3D do osso novo presente na parte superior da SrCHA, com osso trabecular e o esqueleto representativo da rede de trabéculas.

4.4.2 Parâmetros morfométricos

Os parâmetros morfométricos de uma imagem tomográfica podem ser mensurados tanto tridimensionalmente, o que compreende uma medida direta baseada em um volume ou superfície volumétrica renderizada; ou bidimensionalmente, medidos a partir de cortes na imagem. Neste trabalho foram usadas medidas em 3D dos diversos parâmetros morfométricos, tais como (para o osso trabecular): BV/TV (fração de volume ósseo ocupado no volume da região de interesse), Tb.Th (espessura trabecular), Tb.Sp (separação trabecular), comprimento médio trabecular; no caso do biomaterial, foram computados: distribuição do volume e diâmetro equivalente de fragmentos de biomaterial, e número total de partículas.

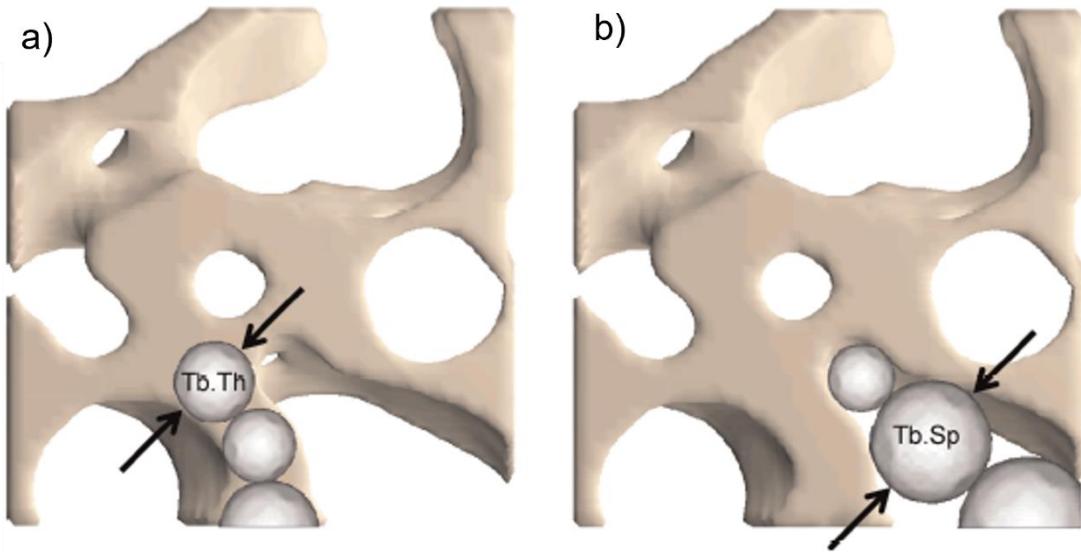


Figura 23: Modelo de quantificação por preenchimento de esferas, tanto para o cálculo da a) espessura trabecular (Tb.Th) quanto da b) separação de trabéculas (Tb.Sp). Adaptado de (BOUXSEIN et al., 2010).

Os cálculos dos parâmetros 3D foram realizados no Avizo, que utiliza o modelo de crescimento de esferas para este processo. Neste modelo, a espessura local de um objeto em um dado ponto na imagem, é dada pelo diâmetro de uma esfera, sendo que a esfera deve conter o ponto (sendo este não necessariamente o centro da esfera), e estar inteiramente dentro dos limites da superfície sólida medida (no caso da Figura 23-a, a superfície sólida que limita a esfera é uma região de uma trabécula). A eficiência deste modelo, em comparação com mensurações 2D realizadas por cortes de microCT, reside basicamente na drástica redução do viés relacionado à orientação tridimensional de um objeto no volume analisado (ULRICH et al., 1999). Este é um método baseado em transformadas de distância (REMY e THIEL, 2002), no qual é realizada inicialmente a esqueletização do volume, que identifica o eixo médio de todos os segmentos da imagem, sendo estes, então, usados como referência para o crescimento de esferas no interior de um objeto na imagem.

Analogamente, a espessura trabecular (Tb.Sp) é medida da mesma maneira, porém levando em conta os espaços vazios da imagem (Figura 23-b), ou seja, os voxels com valor de nível igual a zero na imagem binarizada.

5. Resultados e Discussões

Os resultados estão dispostos de acordo com a respectiva técnica. A microCT permitiu a caracterização através de parâmetros morfométricos e análises quantitativas relativas à organização das trabéculas quanto à sua arquitetura. Pela técnica de FIB-SEM foi possível analisar a interação entre o material e o osso novo, enriquecendo a caracterização da amostra contendo SrCHA.

5.1 SR-microCT

O presente estudo objetivou analisar como a fragmentação dos biomateriais afeta o osso novo formado em sua presença. Para tal, foi realizada uma seleção de amostras que compreendesse diferentes padrões de fragmentação. Nesta seção são discutidos os resultados obtidos a partir da técnica de microCT por luz síncrotron.

5.1.1 HA

Após 21 dias de implantação, foram contabilizados 24 fragmentos desconectados de biomaterial na amostra de hidroxiapatita (HA), ocupando aproximadamente 32% do espaço correspondente ao defeito. A Figura 24-a,b compreende a renderização de modelos 3D das fases segmentadas do biomaterial (amarelo) e osso (laranja), onde é possível observar que a estrutura esférica das microesferas é ainda perceptível, tamanha sua baixa fragmentação. No entanto, pequenas formações ósseas foram identificadas na amostra, na forma de conexões trabeculares conectando fragmentos do biomaterial (Figura 24-c,d).

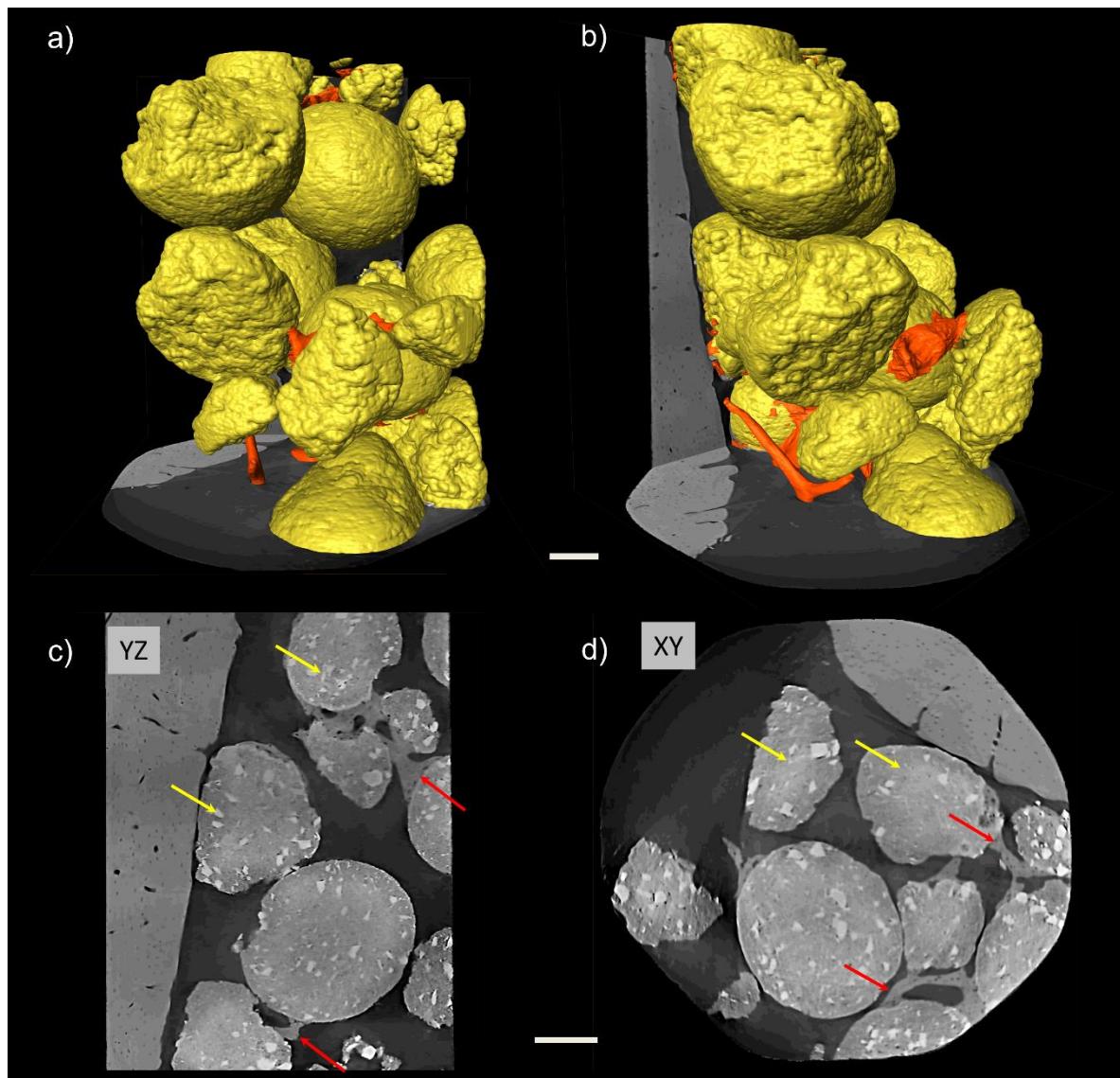


Figura 24: HA. a,b) Modelos 3D observados em dois ângulos diferentes, com biomaterial em amarelo e osso novo em laranja. c,d) cortes no eixo YZ e XY, respectivamente. Setas amarelas apontam para o biomaterial e vermelhas para osso novo formado entre os fragmentos. Escalas: 200 μ m.

Da baixa fragmentação dos fragmentos também decorre um espaçamento limitado entre os fragmentos, como ilustrado na Figura 25-a. Em um corte no plano xy, foram feitas medidas tomando o menor espaço entre fragmentos próximos, onde é possível perceber que 82% das distâncias medidas está entre 15-86 μ m, apenas dois fragmentos com distância superior à 100 μ m um do outro, e ainda, é possível identificar fragmentos efetivamente conectados a um outro vizinho.

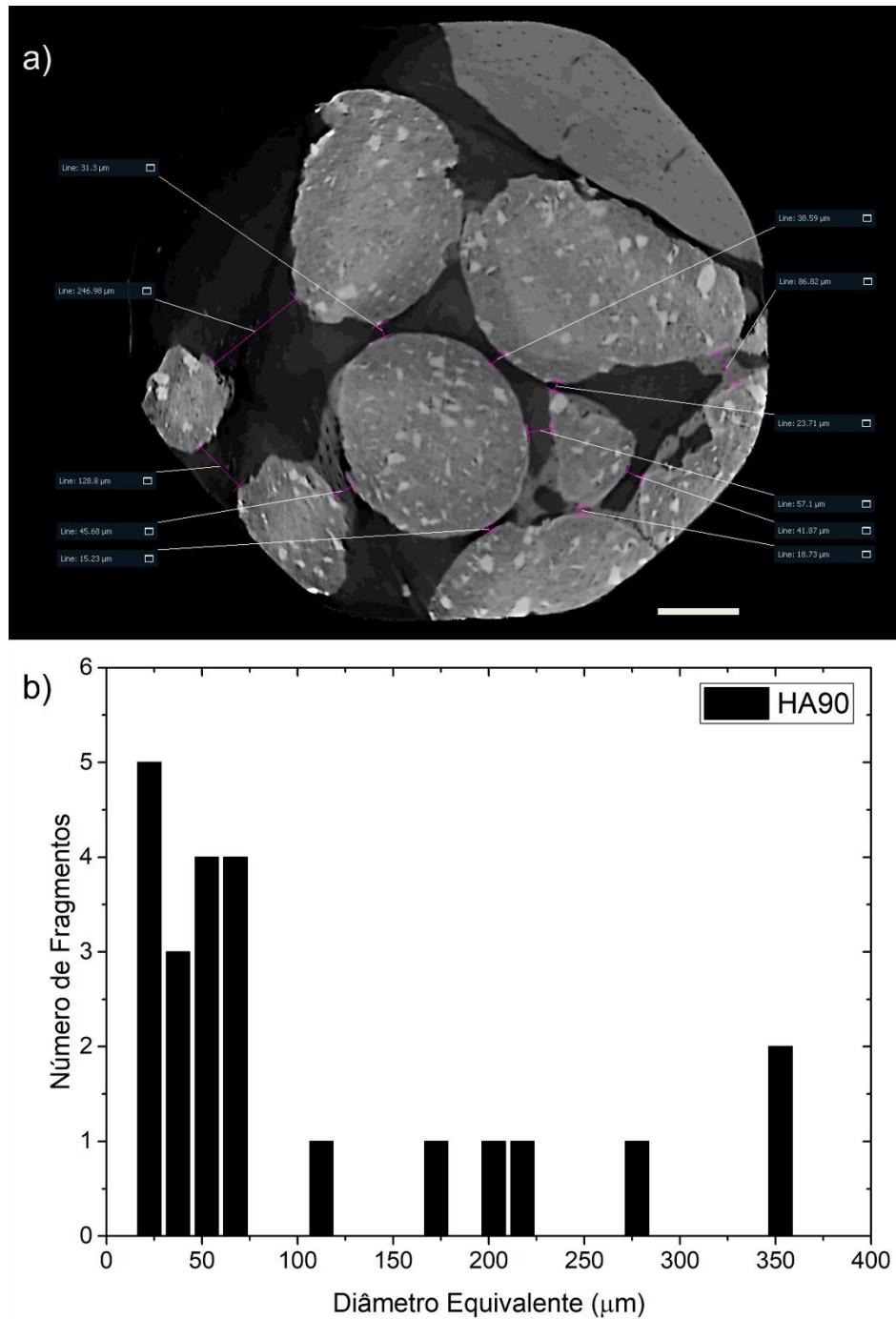


Figura 25: HA. a) Corte no plano XY, indicando a medida de menor distância entre fragmentos próximos (escala: 190 μm). b) Número de fragmentos por diâmetro equivalente.

Os diâmetros equivalentes (D_{EQ}) dos fragmentos de biomaterial foram medidos. O diâmetro equivalente de um dado fragmento é o diâmetro de uma esfera com volume igual ao fragmento em questão. 30% dos fragmentos possuem diâmetro equivalente maior que 100

μm (Figura 25-b), tendo sido observadas microesferas ainda muito bem preservadas ($D_{EQ} > 200 \mu\text{m}$), dado que o diâmetro destas é, no momento da implantação, entre 425-600 μm .

A biocompatibilidade da hidroxiapatita confere ao biomaterial uma superfície favorável para o crescimento ósseo, tendo sido observada a formação de camadas de osso na superfície do biomaterial (Figura 26-a), com espessuras que chegam a pouco mais de 20 μm , similar ao observado por (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021) com a amostra de CHA sintetizada à 37°C (CHA37). O osso formado nesta amostra comprehende aproximadamente 1% do volume relativo, apenas. Dado que o biomaterial é osteocondutor, sua fragmentação ter se configurado em poucas partículas que ocupam grande parte do volume, parece ter restringido o espaço disponível para o osso novo crescer, provavelmente limitando o acesso das células às superfícies do material. A formação de trabéculas conectando partes de biomaterial foram observadas predominantemente em regiões onde fragmentos menores estão presentes, como ilustrado na Figura 26-a. A distribuição da espessura trabecular foi calculada, com ajuste gaussiano com pico em 30,3 μm . Apesar de ser costumeiro representar a espessura trabecular (Tb.Th) de uma amostra como um valor médio a partir de uma gaussiana, é importante perceber que a distribuição contém 3 picos, centrados em 22,3 μm , 35,4 μm e 43,2 μm , respectivamente. No período experimental avaliado, (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021) observaram pico do ajuste gaussiano em 31 μm para a amostra de CHA37, contudo com uma distribuição mais regular, sugerindo que a formação óssea na HA está provavelmente em estágio anterior ao caso da literatura, e que o baixo volume ósseo encontrado nesta amostra pode ser responsável pela presença dos 3 picos observados na análise.

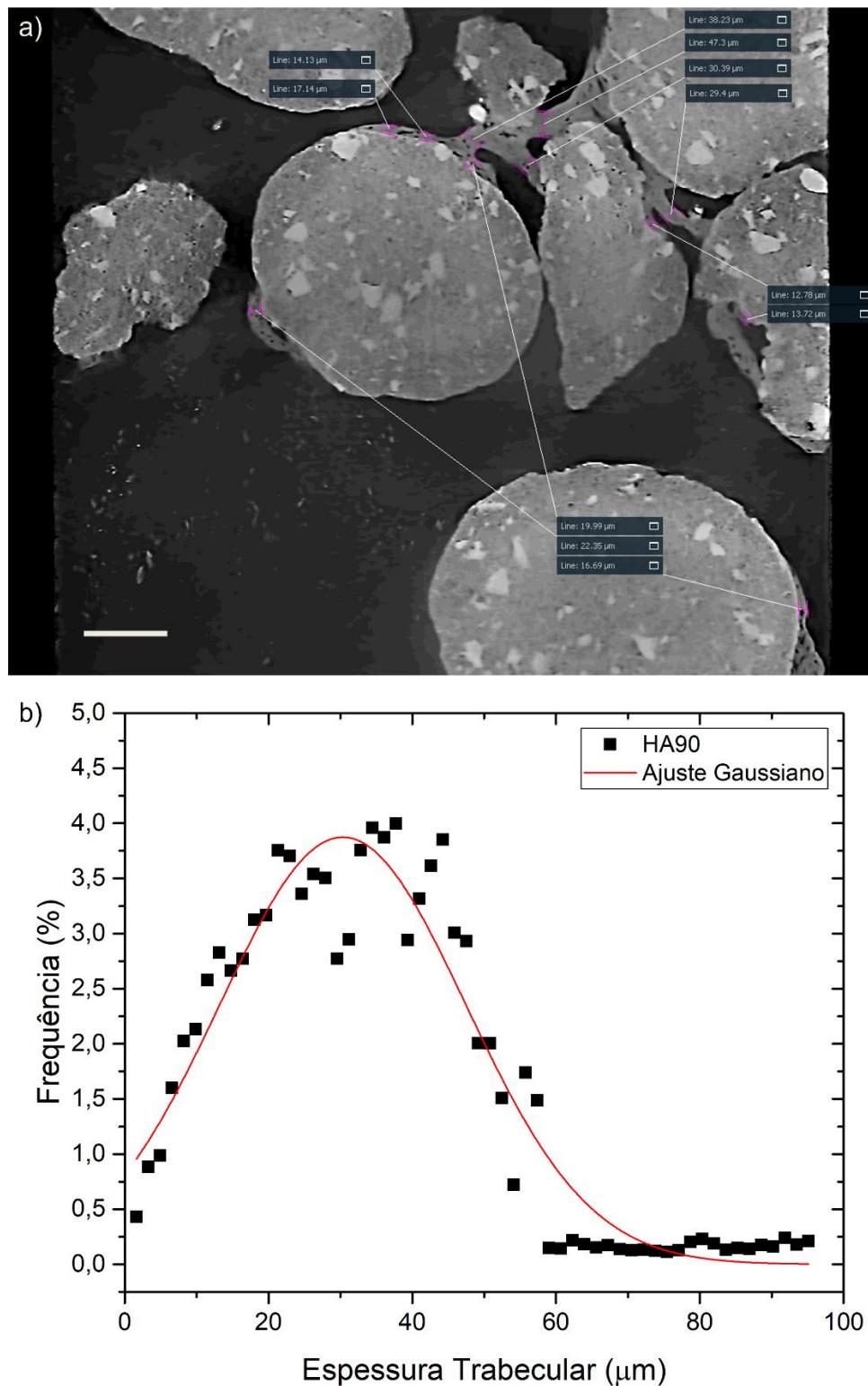


Figura 26: HA. a) Corte no plano XZ, com medidas da camada óssea na superfície do biomaterial e de espessura de trabéculas (canto superior direito), escala: 150 μm . b) Distribuição da espessura trabecular, com ajuste gaussiano com pico em 30,3 μm .

5.1.2 CHA

As fases segmentadas da amostra CHA, que consistem no biomaterial (amarelo) e osso novo formado em sua vizinhança (laranja), renderizados juntos e separados, estão demonstradas na Figura 27-a,b. A fragmentação das microesferas de CHA não se deu na forma de fragmentos menores, mas sim na formação de um grande aglomerado constituído de nanopartículas e alginato. O biomaterial ocupou cerca de 30 % do volume analisado, em 121 fragmentos.

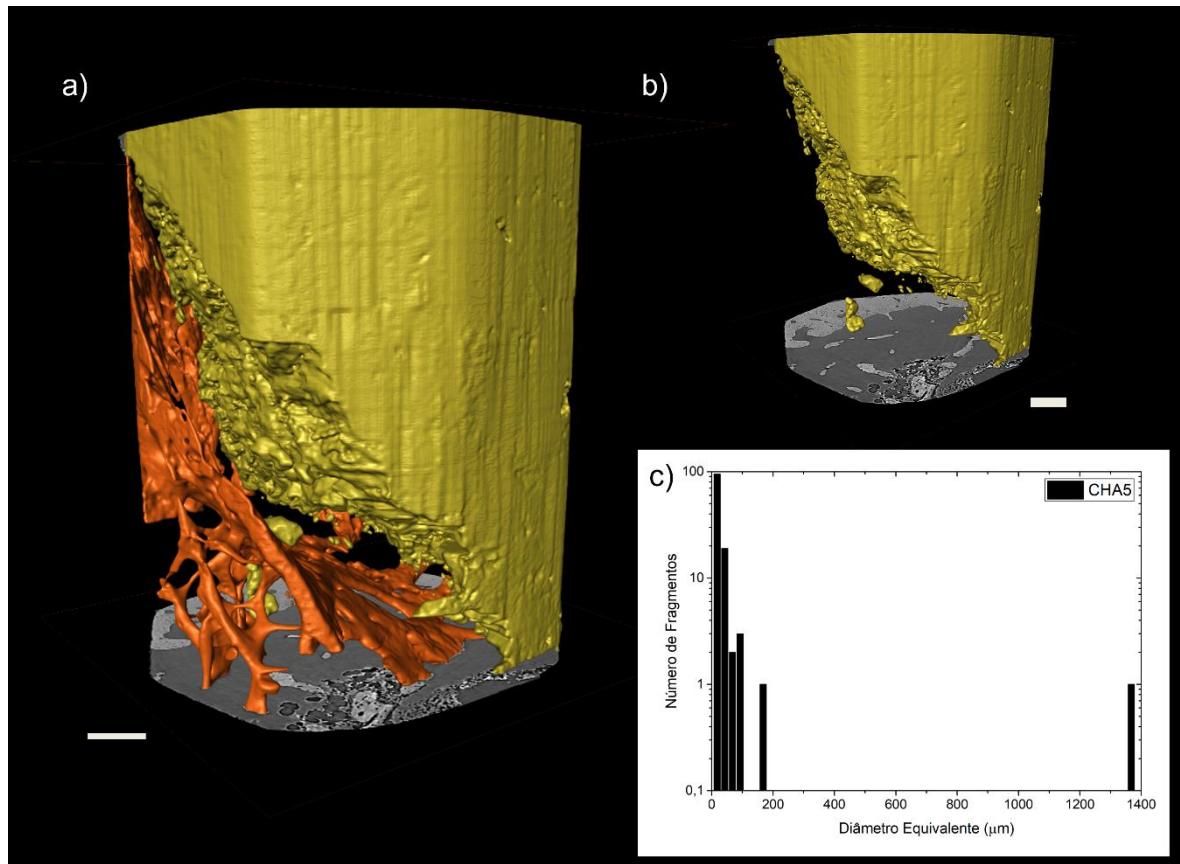


Figura 27: CHA. Modelos 3D da amostra contendo a) ambas as fases de osso (laranja) e biomaterial (amarelo), e b) apenas biomaterial. c) Distribuição do diâmetro equivalente dos fragmentos. Escala: 200 μm .

Os números de fragmentos consistem em um dado importante no estudo da fragmentação dos biomateriais, no entanto é preciso ser analisado junto ao tamanho dos fragmentos encontrados nas amostras, de modo a efetivamente caracterizar sua fragmentação. O número de fragmentos da CHA é muito similar ao da CHA37 (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021), por exemplo, no entanto a distribuição do tamanho dos fragmentos

observada é drasticamente diferente (Figura 27-c). O aglomerado possui diâmetro equivalente a uma esfera de quase 1400 μm , correspondendo ao volume de mais de 12 microesferas de 600 μm .

O efeito deste tipo de fragmentação foi o pior, dentre as amostras analisadas, no que se refere à integração entre osso novo e material, dado que o osso neoformado não se aderiu ao aglomerado, tendo crescido, neste caso, apesar do biomaterial, circundando-o, como pode ser observado nas imagens (Figura 28- a,b).

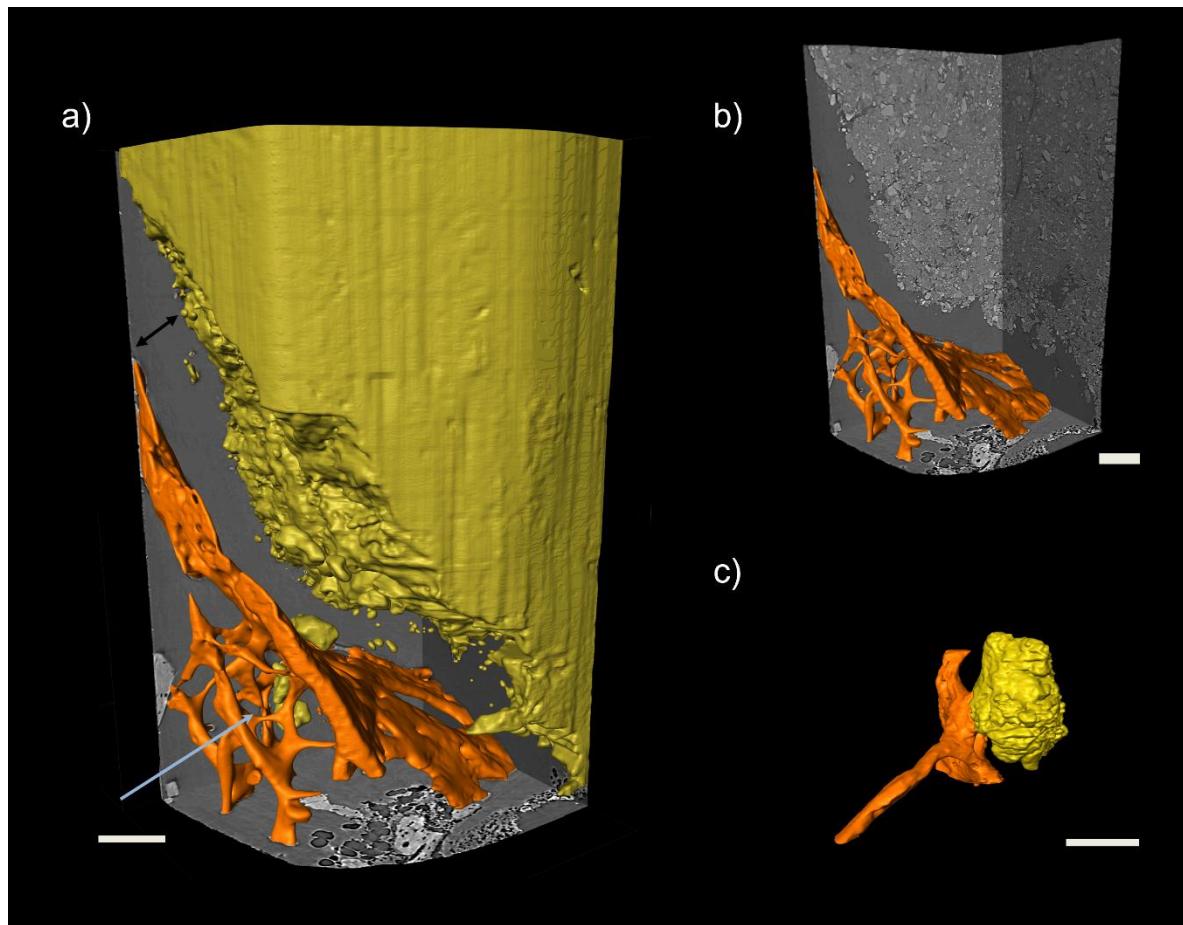


Figura 28: a) Modelo 3D da CHA, com vistas das projeções nos 3 planos, onde é possível ver uma lacuna entre o biomaterial e a rede trabecular formada (seta preta). b) Renderização somente da fase correspondente ao osso novo, as projeções nos três planos complementam a primeira figura (escala: 200 μm). c) Fragmento conectado a uma trabécula, situado na região da seta azul em a) (escala: 80 μm).

Medidas realizadas ao longo do espaço entre o osso e o biomaterial mostraram que a variação da distância entre ambos (melhor observada nas Figuras 28-a,b), variou entre 150 e

300 μm (espaço apontado pela seta preta na Figura 28-a). Por outro lado, também foi observado um fragmento menor de biomaterial que, fora do grande aglomerado, foi conectado à rede trabecular formada (Figura 28-c, região indicada por seta azul na Figura 28-a). Este resultado está ao encontro do observado por outras técnicas e reportados na literatura (MAVROPOULOS *et al.*, 2011 e LIRA *et al.*, 2020), reiterando a osteocondutividade do material que, quando em fragmentos menores, serve como superfície favorável à formação óssea. Com dimensões em micrômetros de aproximadamente 204 x 141 x 130, é um fragmento de CHA como o observado também por (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021) no caso da CHA37, para o mesmo período de implantação (21 dias). A superfície do aglomerado, extremamente disforme e irregular, junto ao seu tamanho, parecem também ter influenciado negativamente à capacidade de adesão de células formadoras de osso, bem como da construção de pontes entre osso e biomaterial, tal qual ocorreu com o fragmento.

A microtomografia por raios X, apesar de ser uma técnica de imageamento poderosa 3D, representa uma “foto” da amostra, ou seja, assim como a maior parte das técnicas de imageamento (e.g. radiografia, fotografia e tomografia por outras fontes), o resultado não comprehende variação temporal, representando apenas o estado da amostra em um momento específico. Neste caso, no período de 21 dias após a implantação. É necessário, portanto, fazer uma consideração sobre uma outra possibilidade sobre o que pode ter ocorrido na CHA. Dada a maneira que o biomaterial se degradou, também é possível que uma camada de alginato tenha se concentrado na extremidade do volume do aglomerado, tendo este servido como superfície osteocondutora em um período inicial após a implantação, e que tenha se dissolvido previamente à eutanásia do animal e subsequente fixação da amostra de tíbia em resina e análise por microtomografia. Fatores que corroboram esta hipótese são a distância entre biomaterial e osso relativamente constante, bem como a forma do osso neoformado na vizinhança do espaçamento entre ambos. Este trabalho não teve como objetivo caracterizar como se dá a fragmentação dos biomateriais ao longo do tempo, para isto seriam necessárias medidas em tempos diferentes de implantação. Contudo, o que pôde ser observado, considerando esta hipótese ou não, é que o aglomerado formado no período analisado (Figs. 27 e 28) efetivamente não configurou uma superfície favorável ao crescimento ósseo, tal qual explanado anteriormente.

5.1.3 SrCHA

As microesferas contendo hidroxiapatita carbonatada dopada com estrôncio (SrCHA) apresentaram a maior fragmentação dentre as amostras estudadas. A Figura 29 mostra um gráfico comparativo do número de fragmentos isolados encontrados em cada amostra. O número de fragmentos encontrados na SrCHA é de pelo menos 2 ordens de grandeza de diferença dos demais, tendo sido contabilizados 14765 fragmentos de biomaterial.

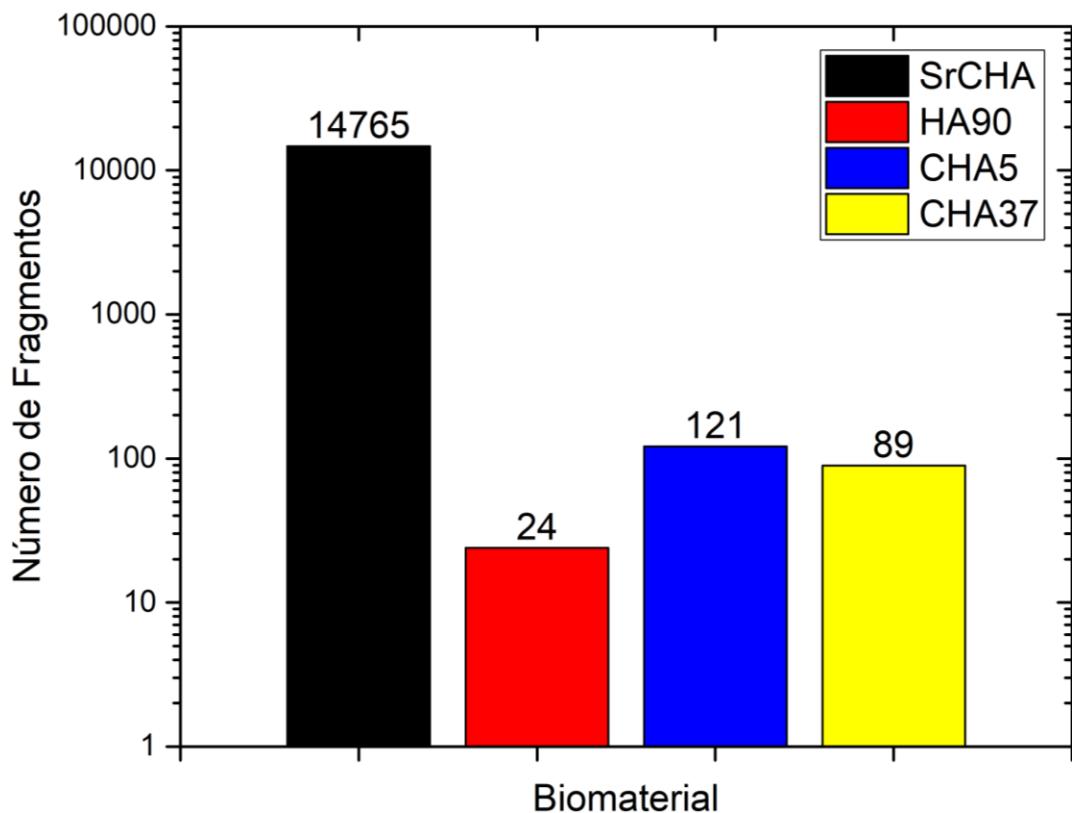


Figura 29: Número de fragmentos de biomaterial encontrados nas amostras de SrCHA (preto, 14765), HA (24, vermelho), CHA (121, azul) e CHA37 (89, amarelo).

A análise visual das imagens de SR-microCT mostraram que o biomaterial da amostra SrCHA, extremamente fragmentado, impregnou o interior do tecido ósseo, tendo se tornado parte da estrutura trabecular. A Figura 30-a mostra um corte transaxial da amostra, na forma de uma fatia do modelo 3D contendo apenas a região trabecular, onde é possível observar as partículas do biomaterial (amarelo) circundados por osso novo (marrom). A partir da

esqueletização das trabéculas, observando apenas a disposição do biomaterial na mesma região (Figura 30-b), torna-se ainda mais perceptível a conformidade dos fragmentos à arquitetura trabecular, evidenciando novamente, agora a partir de uma técnica de imageamento tridimensional, a biocompatibilidade do material.

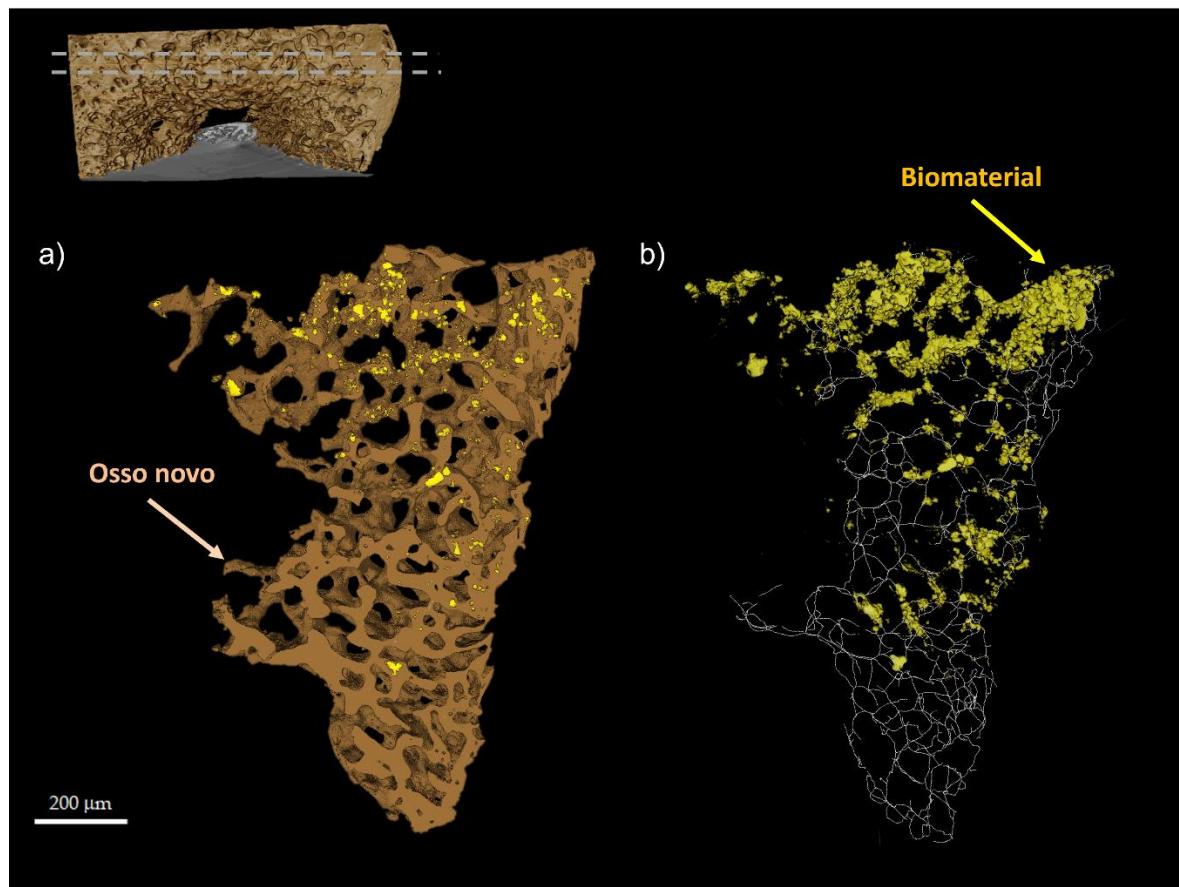


Figura 30: Seção transversal, mostrando a dispersão do biomaterial, em amarelo, a) no interior do osso (marrom), e b) o material como parte integrante do esqueleto que compõe a arquitetura trabecular. No canto superior esquerdo, traços em cinza apontam para a região do corte na figura de referência.

A Figura 31 apresenta um modelo do defeito, em sua vista frontal, sendo a escala de cores usada para representar a variação de espessura das trabéculas na amostra. Na escala, quanto mais próximo do azul, menor a espessura da trabécula representada (até $\sim 30 \mu\text{m}$), e quanto mais próximo do vermelho, maior a espessura (acima de $\sim 50 \mu\text{m}$), com valor intermediário em ciano e verde ($\sim 30-50 \mu\text{m}$). É possível verificar a maior concentração de

trabéculas menos espessas nas extremidades do osso novo mais próxima ao centro, o que é esperado dado que essas são provavelmente as trabéculas mais recém-formadas da amostra.

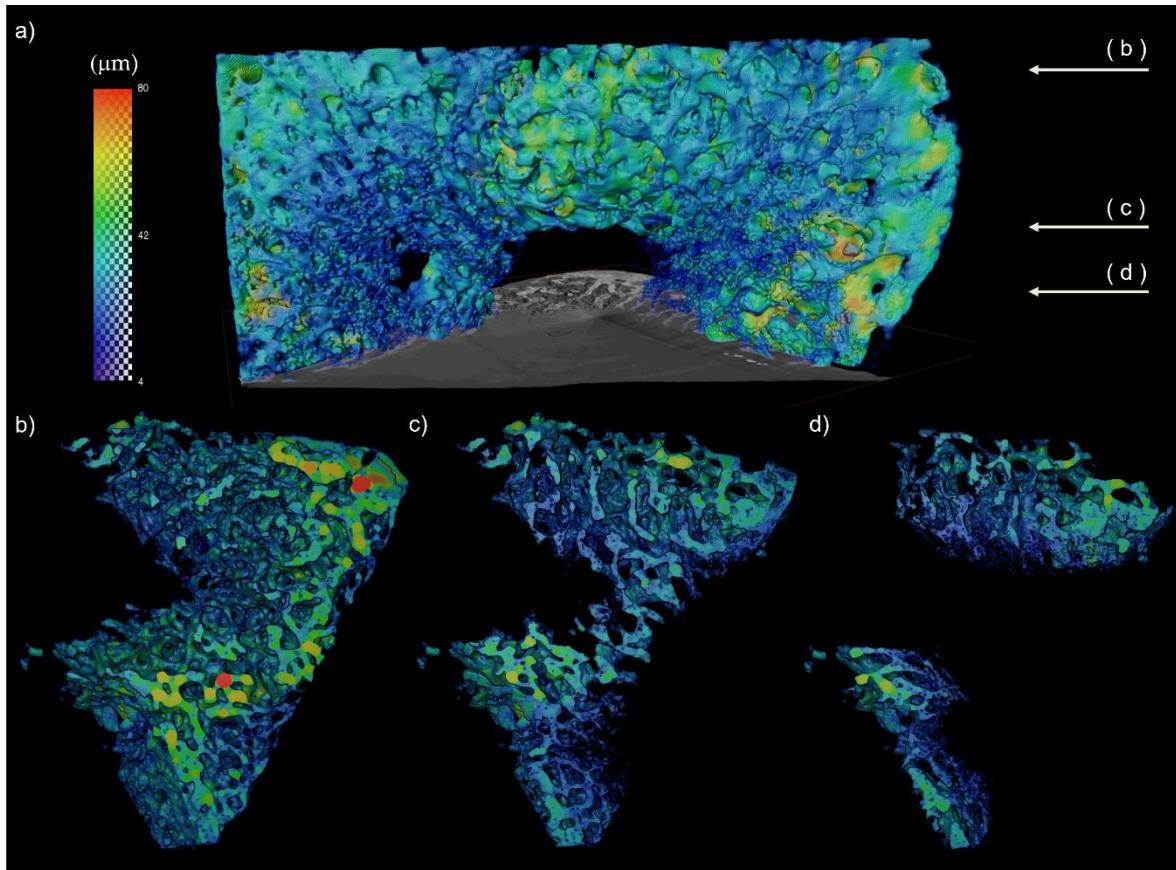


Figura 31: a) Mapa da espessura trabecular da SrCHA expresso por um mapa de calor. b,c,d) Cortes transversais situados nas marcações em a) evidenciam que o intervalo inferior à 40 μm compreende quase a totalidade das espessuras das trabéculas medidas.

A distribuição da espessura trabecular da SrCHA apresentou uma forma gaussiana, com média de 39 μm (Figura 32). Em contrapartida, o valor de referência (CHA37, MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021) possui média de 31 μm , indicando, portanto, que o material contendo estrôncio impactou a morfologia das trabéculas formadas no defeito no tempo estudado.

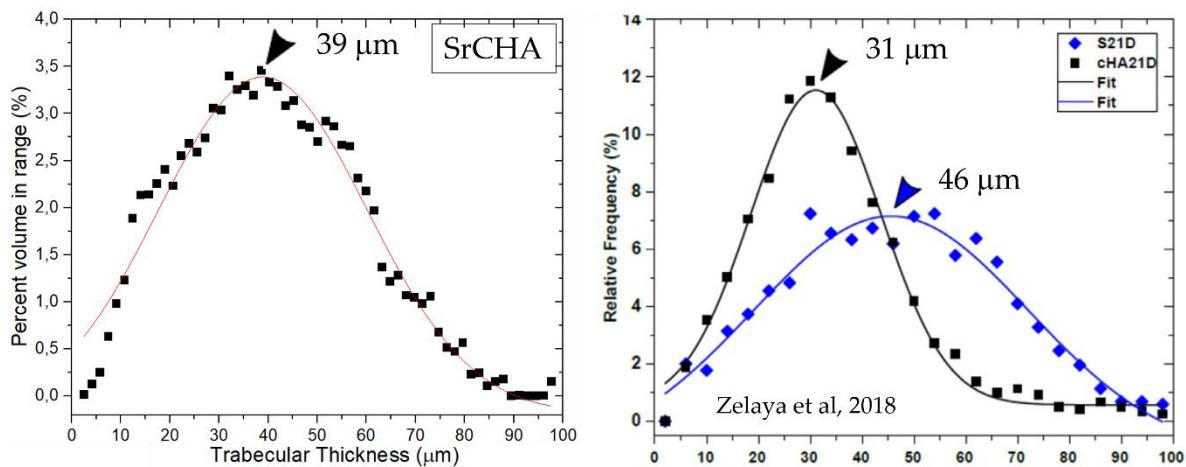


Figura 32: Distribuição da espessura trabecular da SrCHA e referência (CHA37 e coágulo em azul).

A distribuição de comprimento trabecular médio foi medido, tendo sido encontrado um comportamento semelhante entre a SrCHA e a CHA37, contudo não foi verificado uma queda na distribuição ao se aproximar de 0 na SrCHA, como visto na CHA37 e no coágulo (amostra com defeito sem implantação de biomaterial, Figura 33). Ademais, mais de 50% das trabéculas têm comprimento médio inferior a 50 μm , e a maior concentração de trabéculas (12%) tem até 20 μm .

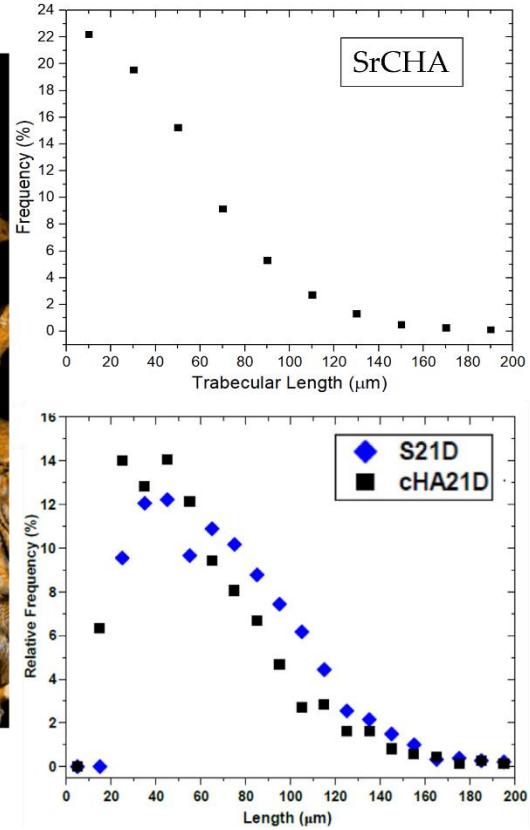
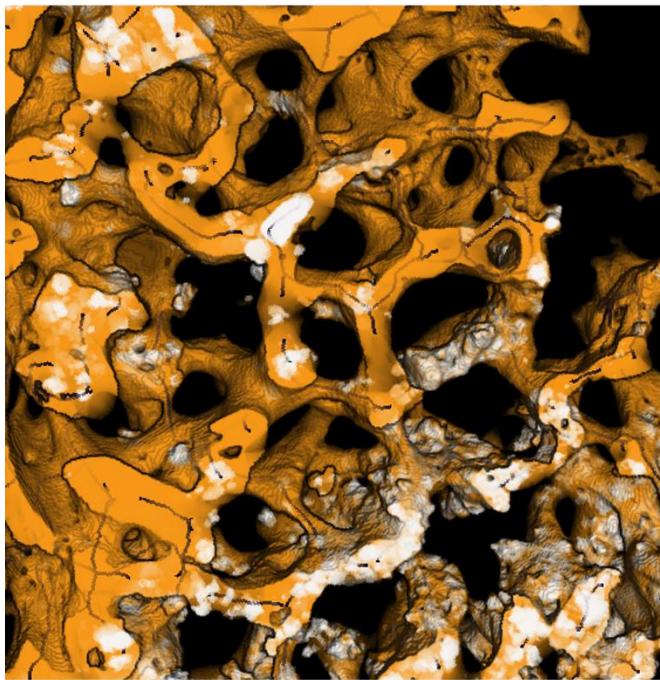


Figura 33: Comprimento trabecular da SrCHA e referência.

As medidas das distribuições de espessura óssea e comprimento trabecular evidenciam, também, que a técnica de SR-uCT se faz verdadeiramente necessária no estudo deste tipo de neoformação óssea. As medidas de partes da imagem com espessura inferior a 15 μm .

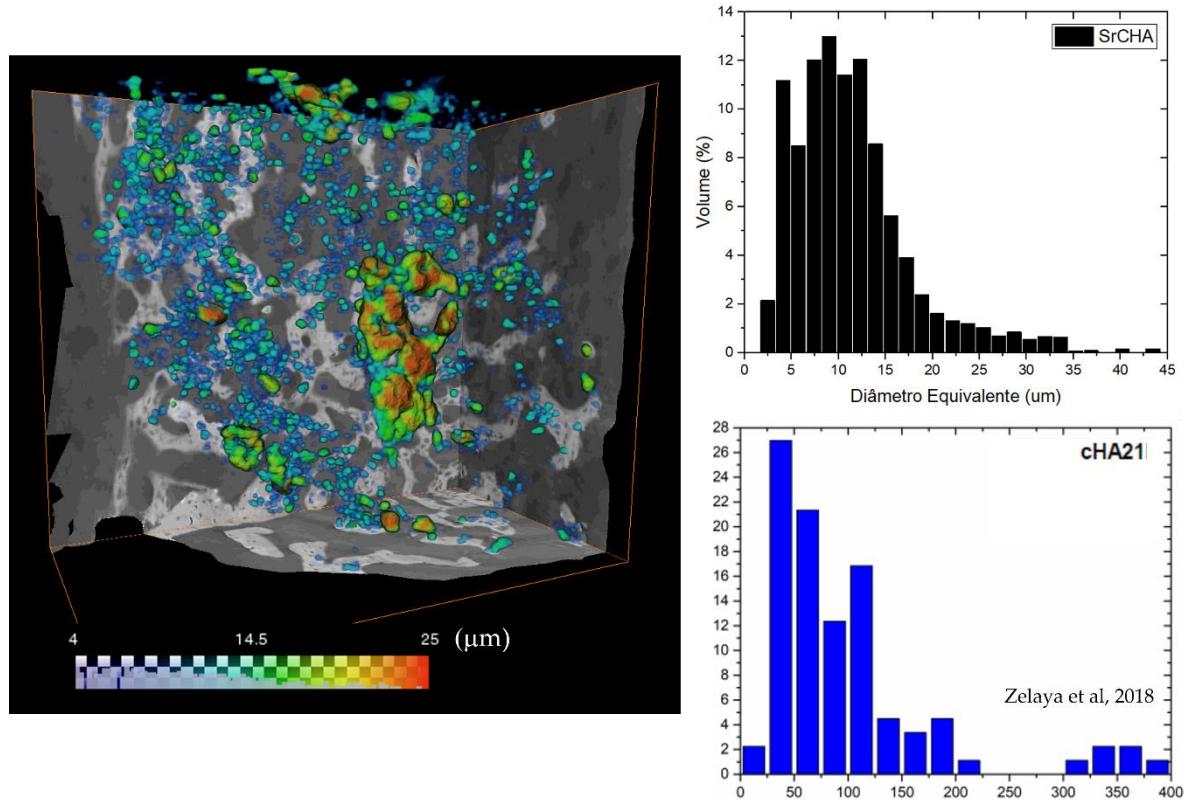


Figura 34: Diâmetro equivalente dos fragmentos. No mapa de cores, quanto mais azulado o fragmento mais perto de 4 μm é seu diâmetro, e quanto mais avermelhado mais se aproxima de 25 μm ou superior. Distribuição dos diâmetros de fragmentos representado pela frequência relativa (%), comparando a SrCHA com a CHA37 (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021).

Foi possível evidenciar quantitativamente a diferença entre a distribuições de ambos os materiais (CHA37 e SrCHA). Enquanto o CHA37 demonstrou uma distribuição de ampla variabilidade de diâmetro equivalente, contendo ainda fragmentos grandes (300-400 μm), e com a maioria de seus fragmentos na faixa de 25-100 μm , a SrCHA, por outro lado, não possui fragmentos de diâmetro equivalente superior à 45 μm . Na SrCHA, a maioria dos fragmentos (~70%) têm menos de 12 μm de diâmetro equivalente, com 22 % no intervalo 12-20 μm e o restante na faixa de 20-45 μm . Ressaltando que as microesferas, no momento da implantação, possuem diâmetro máximo de cerca de 600 μm , verifica-se que aproximadamente 90% dos fragmentos possuem diâmetro equivalente a trigésima parte de uma microesfera original. Este resultado, em paralelo à distribuição de espessura trabecular encontrada na amostra de SrCHA e a análise visual da amostra, aponta para o fato de que a

presença do material alojado dentro do tecido ósseo é responsável pela diferença entre a espessura média trabecular entre a SrCHA e a CHA, uma vez que a diferença entre ambos é de $\sim 8 \mu\text{m}$.

A caracterização do impacto da fragmentação do biomaterial na arquitetura óssea consiste, além dos parâmetros morfométricos, no estudo da arquitetura trabecular. Nesse sentido, faz-se necessário avaliar a distribuição dos nodos 3N, 4N e 5N da amostra, bem como se dão suas respectivas distribuições angulares e abundâncias relativas.

A distribuição angular dos nodos 3N da SrCHA é mostrada na Figura 35. Foi verificado que os ângulos deste nodo configuram uma distribuição gaussiana. A média do ajuste gaussiano encontrado foi de 114.1° , com desvio padrão $\sigma = 31.1^\circ$, resultado basicamente igual ao encontrado por (MARTINEZ-ZELAYA *et al.*, 2021) na amostra de referência (CHA37), que apresentou 114.5° de média ($\sigma = 36.8^\circ$).

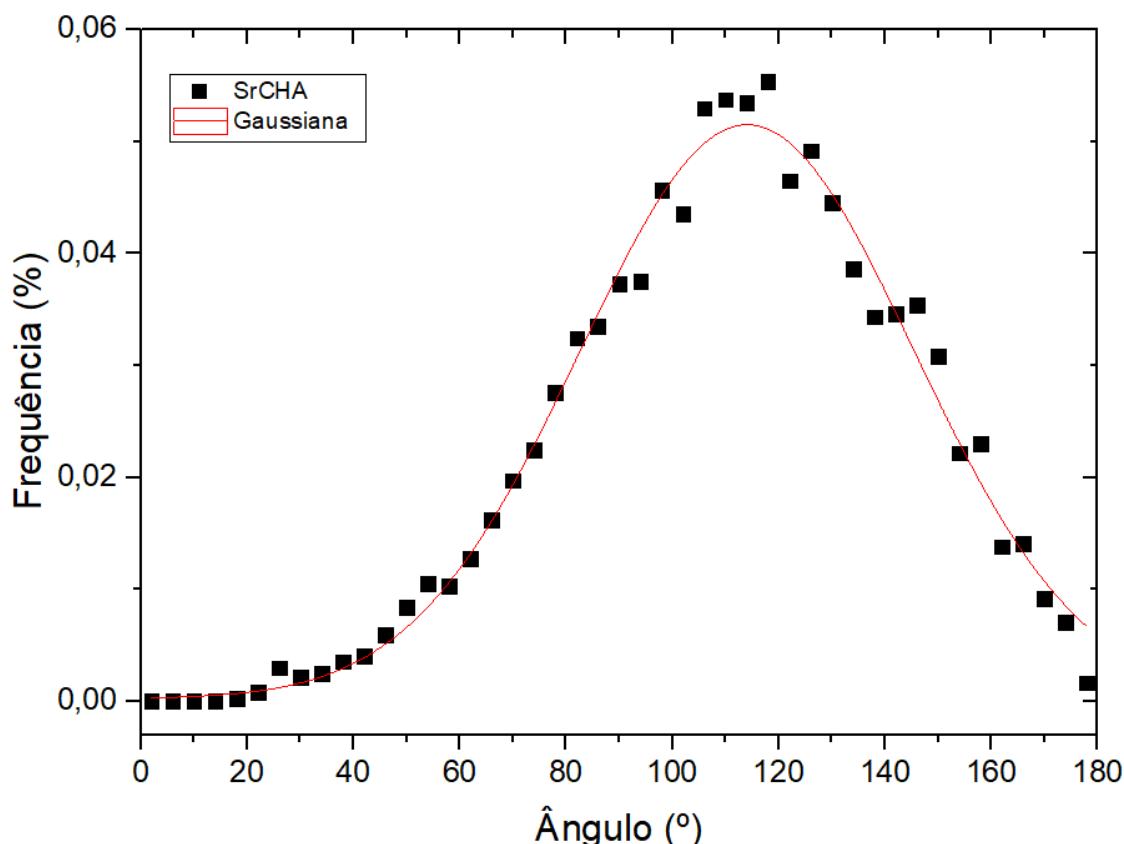


Figura 35: Distribuição angular dos nodos do tipo 3N da SrCHA.

Em uma estrutura de tensegridade ideal, organizada por nodos do tipo 3N, as arestas estão igualmente afastadas uma da outra, com ângulos de 120° entre elas. Idealmente, também, as arestas estariam todas no mesmo plano. A planaridade dos ângulos 3N foi calculada, e representa um desvio angular do plano formado pelas arestas daquele que seria o da organização do caso ideal, zero. A planaridade, portanto, é um índice que varia entre 0 e 1, onde 0 significa que as trabéculas do nodo 3N estão no mesmo plano, enquanto 1 seria o caso onde as trabéculas estariam paralelas, contudo neste caso isso seria extremamente improvável, uma vez que computar trabéculas paralelas aqui equivaleria à não ter removido, no esqueleto, os segmentos paralelos contidos numa mesma trabécula, sendo que em dois momentos diferentes tais segmentos são eliminados, tanto no Avizo durante a esqueletização, quanto no próprio ITA app.

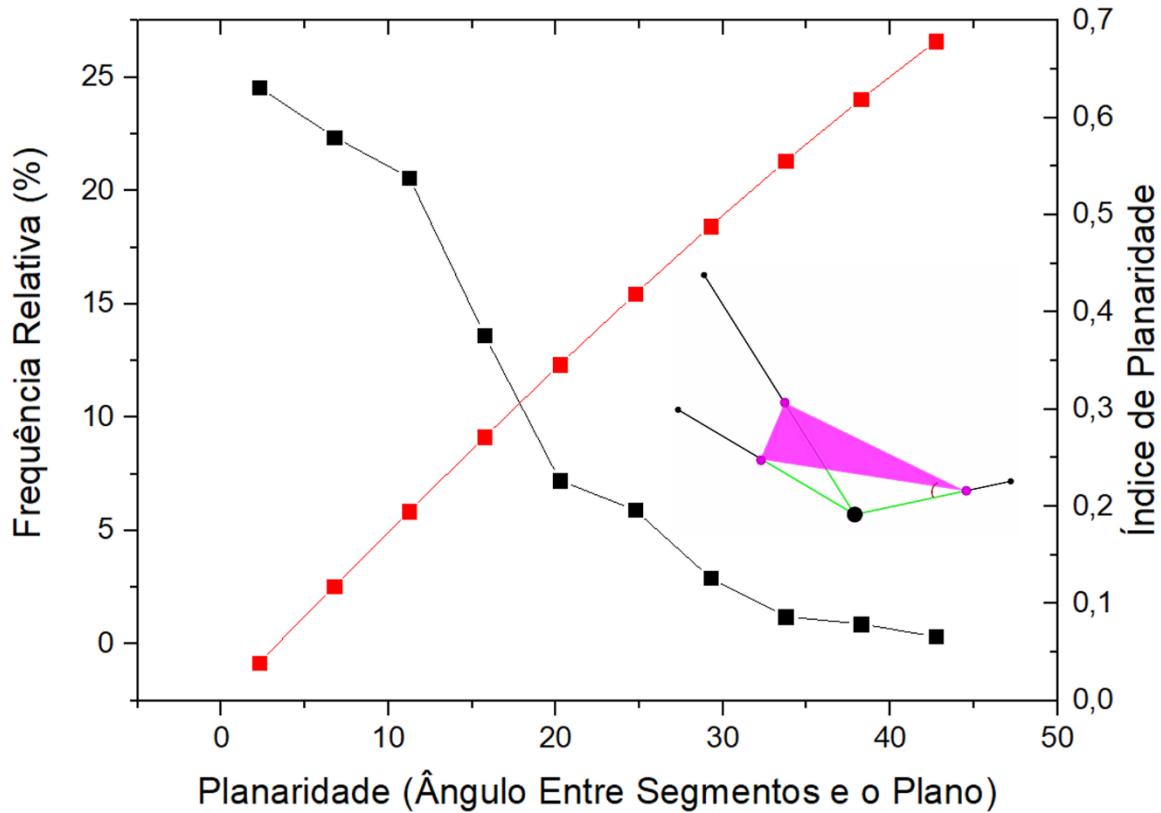


Figura 36: Planaridade dos nodos 3N (ângulo desenhado na ilustração com relação à frequência relativa (preto) e o índice de planaridade (vermelho).

O índice de planaridade é dado pelo seno do ângulo formado pelo plano do que seria o nodo ideal e o ângulo formado pelas trabéculas de um nodo 3N real (ilustração na Fig. 36).

O cálculo da planaridade mostrou que cerca de 59 % dos nodos 3N possuem um desvio de até 10° de um plano perfeito de uma estrutura de tensegridade; cerca de 84 % têm desvio de até 20° e aproximadamente 96 % têm até 28° de desvio. Comparando ao que (MARTINEZ-ZELAYA *et al*, 2021) encontraram para a CHA37, onde ~ 85 % dos nodos 3N possuem menos que 10° de desvio, pode-se inferir que a presença dos fragmentos de biomaterial efetivamente dentro das trabéculas na SrCHA afetou este parâmetro.

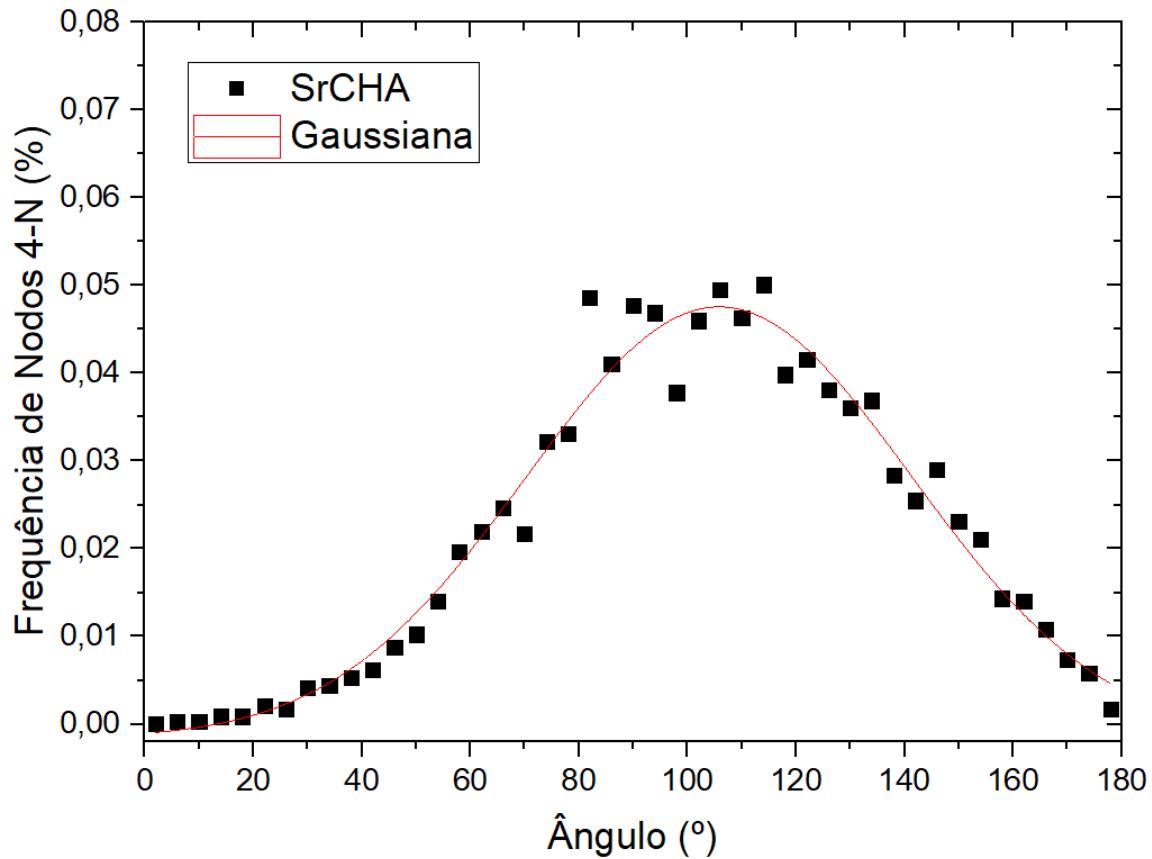


Figura 37: Distribuição angular dos nodos do tipo 4N da SrCHA.

Os ângulos dos nós 4N foram calculados, e observou-se também neste caso uma distribuição gaussiana (Fig. 37). A média da gaussiana foi de 105.8° ($\sigma = 35.5^\circ$), precisamente os valores obtidos na CHA. Quanto aos de 5N, a média da gaussiana obtida para a SrCHA foi de 101° ($\sigma = 37.3^\circ$), como pode ser visto na Figura 38, enquanto na referência foi observada média de 97.8° ($\sigma = 39.5$). Em uma estrutura tetraédrica ideal, os ângulos entre as arestas é de 109.5° , valor muito próximo ao valor encontrado na SrCHA.

No caso de estruturas 5N ideais, a média angular é de 100° (considerado que tais estruturas tem 9 ângulos, sendo 3 de 120° e 6 de 90°), também muito similar ao obtido para a SrCHA.

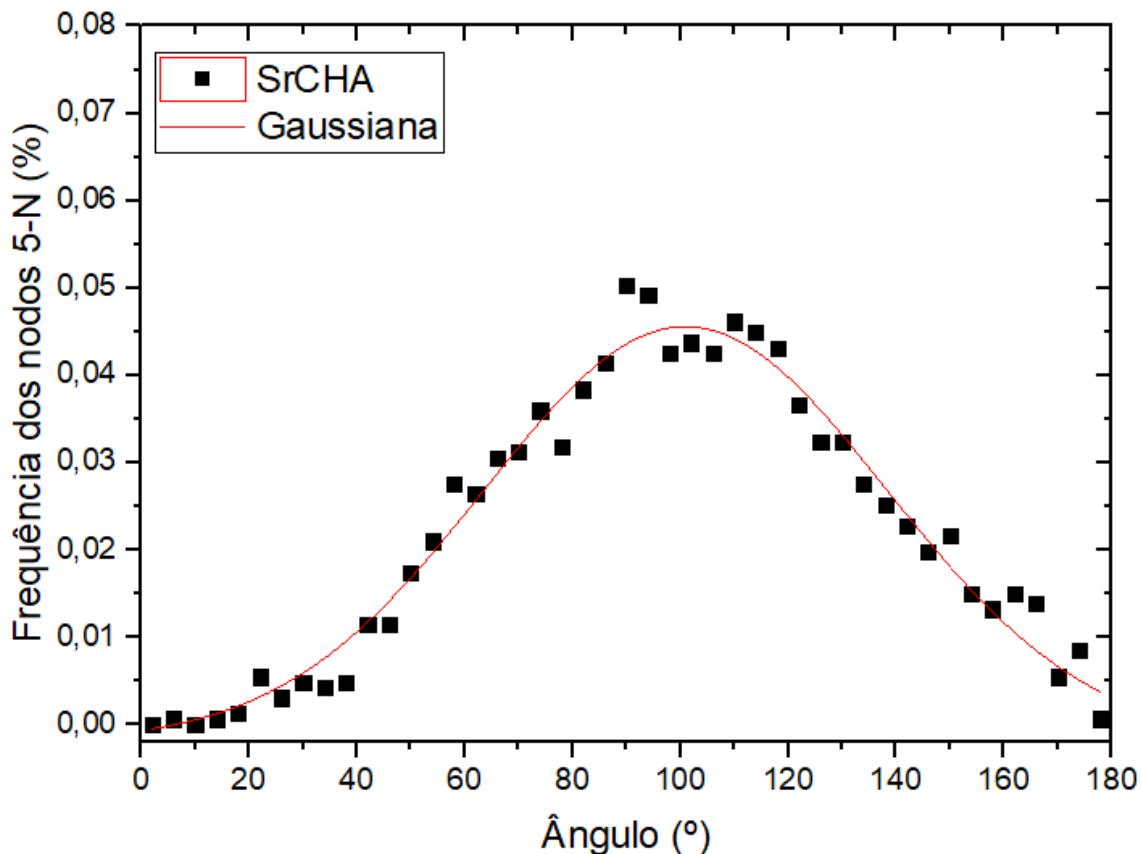


Figura 38: Distribuição angular dos nodos do tipo 5N da SrCHA.

A abundância dos diferentes nodos é representada na Figura 39. Ao todo foram contabilizados 10.407 nodos, dos quais 74,6 % destes são do tipo 3N, 21,8 % são do tipo 4N e 2,9 % do tipo 5N. Cerca de 0,7 % são do tipo 6N. Os valores de referência são 74,1 %, 20,8 % e 3,8 % para os nodos de 3N, 4N e 5N, respectivamente. Observa-se, portanto, uma relativa padronização entre as abundâncias relativas de cada nodo para os biomateriais em questão.

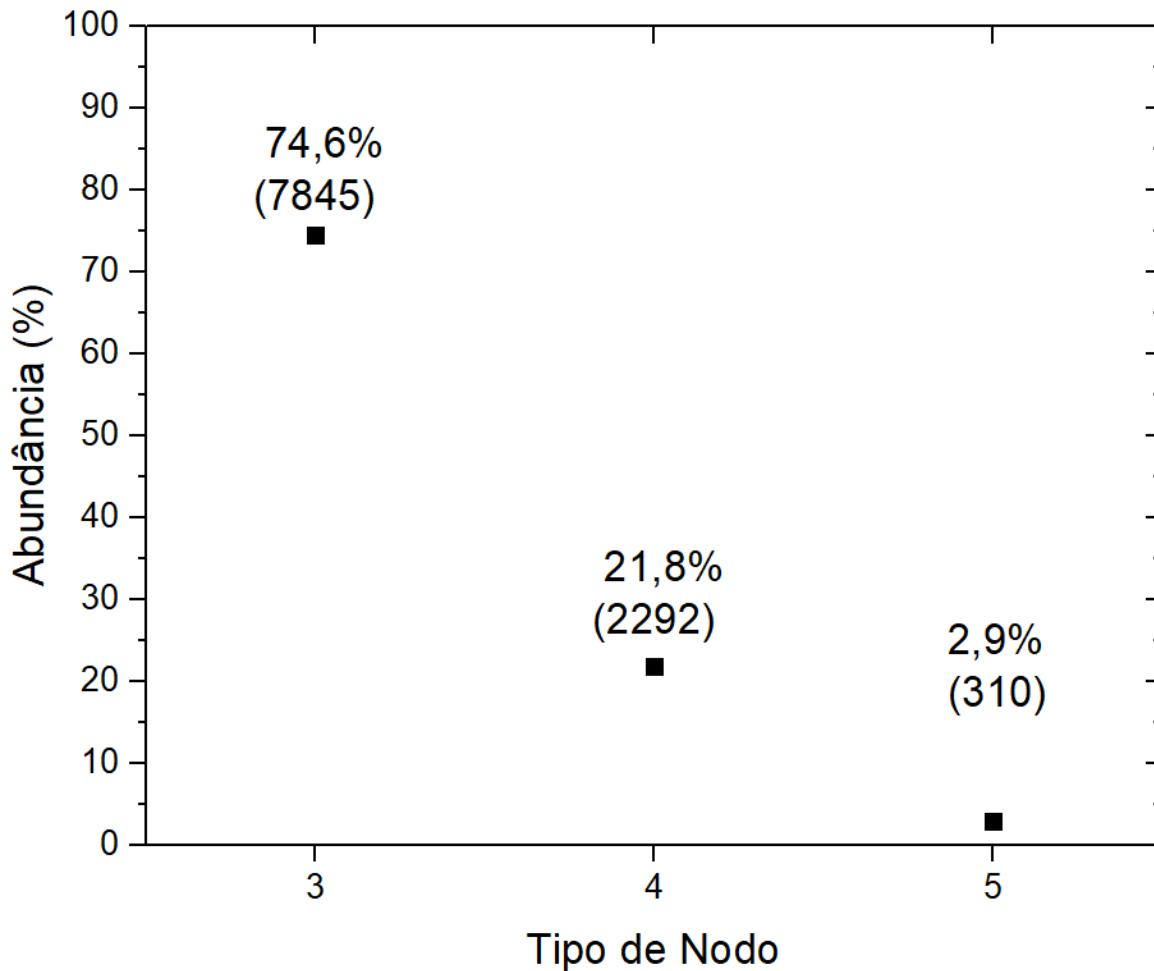


Figura 39: Abundância relativa e número total de nodos encontrados.

Avaliar a osteocondução de biomateriais compostos por SrCHA implantados em um defeito ósseo, analisando como a fragmentação das esferas afeta as estruturas hierárquicas do osso novo formado, foi um dos principais objetivos deste trabalho. A partir da avaliação da abundância de nodos e das distribuições angulares dos nodos do tipo 3N, 4N e 5N, foi possível constatar que o comportamento do osso novo crescido no período estudado (21 dias após implante) não é afetado pelo grau de fragmentação do material composto por fosfato de cálcio contendo Sr para estes parâmetros, tendo sido mantidas tais características relativas à organização trabecular para o biomaterial de alta fragmentação (SrCHA), semelhante ao observado para a CHA37 (MARTINEZ-ZELAYA *et al*, 2021). Contudo, a planaridade dos nodos 3N apresentou uma diferença significativa. Este é um resultado significativo, uma vez que aponta para a possibilidade de que este sistema (osso novo impregnado de fragmentos

micrométricos e submicrométricos de SrCHA) pode representar um importante limiar para o melhor entendimento da organização hierárquica do osso, no qual é verificada a organização trabecular por nodos e suas respectivas distribuições angulares, porém com diferença na planaridade dos nodos 3N. Ademais, parâmetros relativos à morfologia das trabéculas apresentaram diferenças significativas. A diferença de espessura média das trabéculas da SrCHA com relação à CHA37 (~8 μm) é basicamente o diâmetro equivalente da maioria dos fragmentos de SrCHA (onde mais de 70 % dos fragmentos têm até 12 μm), levando-se inclusive em consideração uma margem de ~ 2.5 μm , equivalente à ~ 3 pixels, é possível deduzir, portanto, que a diferença se dá pelo fato de que, na SrCHA, o osso cresceu envolvendo fragmentos micrométricos do material, enquanto na CHA37 o osso cresceu se conectando a fragmentos maiores de material.

5.2 FIB-SEM

A partir do estudo por microCT das amostras de SrCHA, fez-se necessário, de modo a caracterizar mais detalhadamente o fenômeno observado de integração entre o material e o osso neoformado, o uso de técnicas que pudessem sondar essas regiões da amostra em uma escala menor. Neste sentido, a técnica de FIB-SEM foi empregada para sondar diferentes regiões da amostra de SrCHA.

A Figura 40 mostra uma região do defeito escaneada por FIB-SEM. Esta região foi selecionada pela microCT por ser uma região perto do osso cortical, sendo provavelmente uma trabécula mais velha, possibilitando a investigação de como o material se adere ao tecido ósseo desde o início do processo de regeneração no defeito. Neste caso, a trabécula é formada quase que inteiramente por biomaterial.

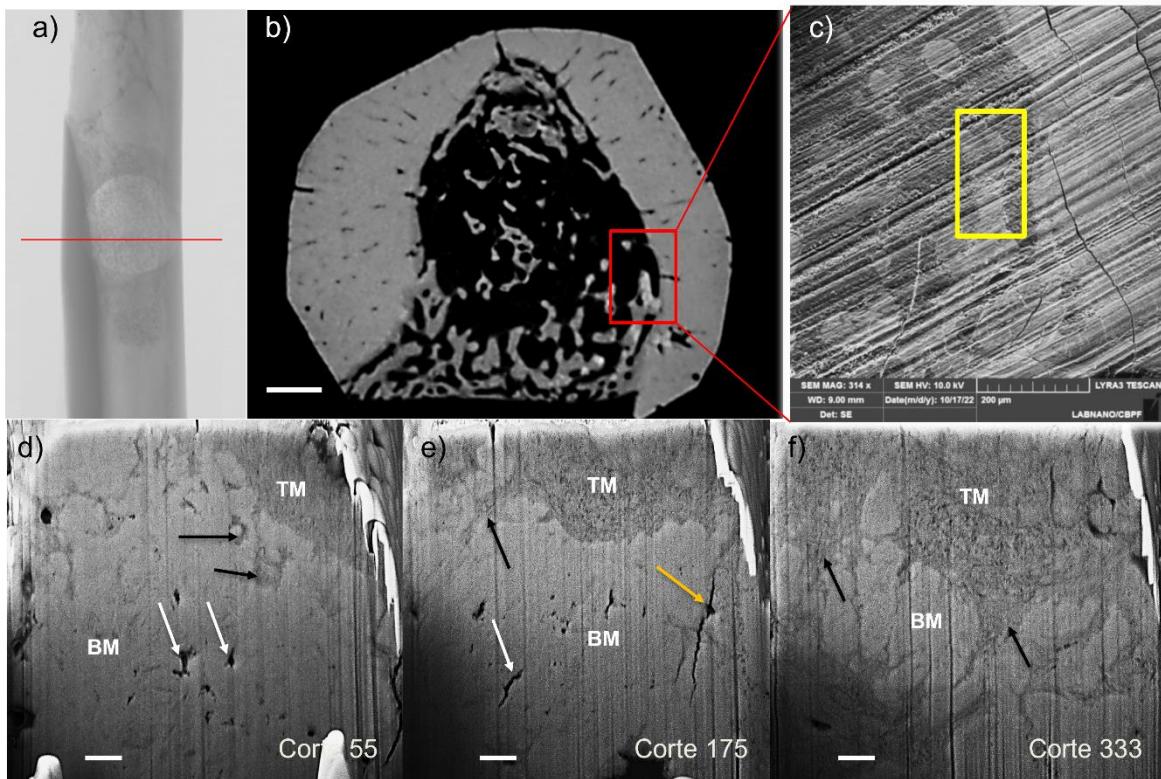


Figura 40: Imagens de FIB-SEM de uma trabécula próxima ao osso cortical. a) Radiografia com marcação do b) corte microtomográfico usado como referência (escala 300 μm). c) Região escaneada por FIB-SEM, e d-f) cortes da série, onde é possível observar o biomaterial (BM), tecido mineralizado (TM), poros “vazios” (setas brancas), poros preenchidos por TM (setas pretas) e um canalículo (seta amarela). Escala de 2 μm .

A análise da série mostrou que os volumes relativos ocupados pelo biomaterial e tecido mineralizado foi de 70% e 29%, respectivamente, como evidenciado pelos cortes (Fig. 40:d-f). Foi possível analisar a porosidade do biomaterial (Fig. 40-d), com poros mais internos “vazios” (setas brancas), ou seja, no contraste das imagens são regiões com nível de cinza perto do 0, e poros mais próximos da interface com o osso novo contendo tecido mineralizado (setas pretas). As regiões identificadas com setas pretas representam regiões de mineralização óssea em meio ao material, estando todas elas conectadas com a superfície externa do fragmento de biomaterial, i.e., na Fig. 40-d as setas pretas apontam poros fechados em um corte, que na verdade são as mesmas regiões apontadas por setas pretas em cortes posteriores (Fig 40-e,f). Foi identificado um canalículo, parte de uma célula formadora de osso, em meio à região de interface (Fig. 40-e).

Em um segundo ensaio, foi escolhida uma região de formação de osso mais recente, na extremidade do defeito, utilizando novamente um corte de microCT como referência (Figura 41 a,b).

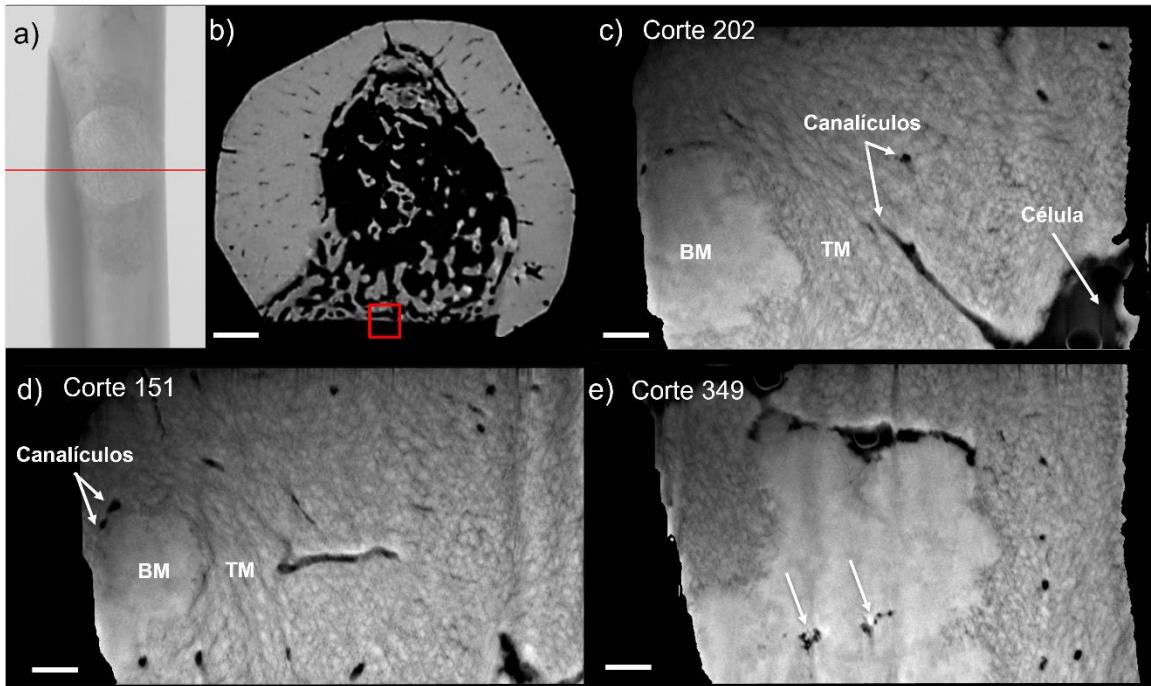


Figura 41: Imageamento por FIB-SEM de uma trabécula na extremidade do defeito. a,b) MicroCT usada como referência (escala 300 μm). c-e) Cortes da série de FIB-SEM mostram o biomaterial (BM) envolto de tecido mineralizado (TM), na vizinhança de canalículos celulares (escala 2 μm).

As Figuras 41-a,b mostram a região em que foi realizada a análise, tendo como referência um corte de microCT. Na região, o biomaterial ocupou volume relativo de 22%, enquanto o osso novo 74%, e osteócitos ocuparam 4% do volume relativo analisado. Foi verificado um fragmento de biomaterial completamente envolto de tecido mineralizado (Figuras 41:c-e), bem como a presença de células responsáveis pelo crescimento ósseo na região, evidenciando novamente a biointegração entre material e osso, como observado na literatura (VALIENSE *et al.*, 2015, KAMMER *et al.*, 2016). Um modelo 3D resultante da segmentação das células foi realizado (Figura 42), onde pode ser melhor observada a ligação dos canalículos celulares ao fragmento de biomaterial.

Três células foram identificadas e segmentadas na série da trabécula na extremidade do defeito (Figura 42). Pôde-se verificar a conexão entre os osteócitos e o fragmento de

biomaterial (células segmentadas em verde e canalículos das segmentadas em azul e vermelho).

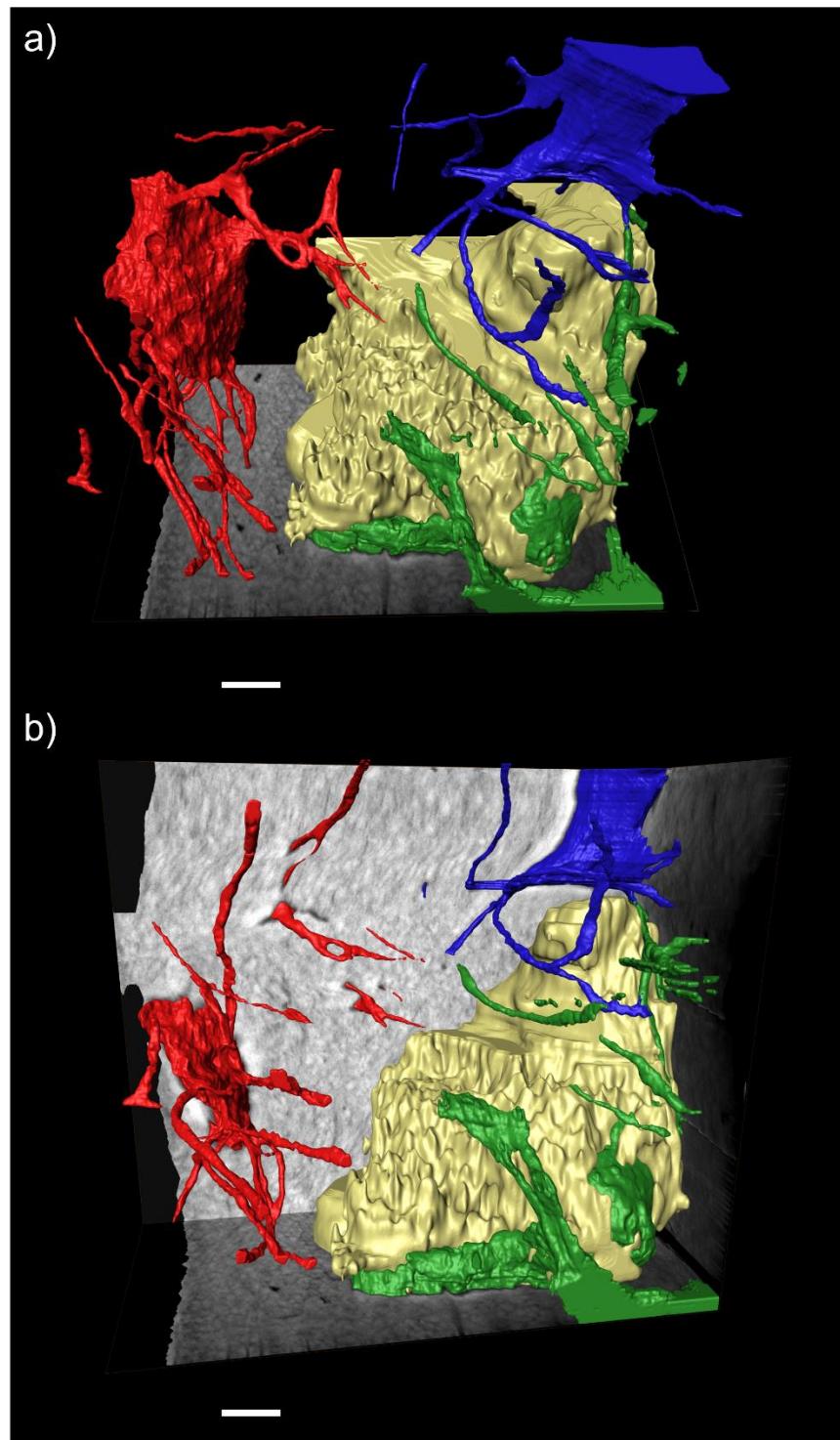


Figura 42: Modelo 3D das células (vermelho, azul e verde) presentes na série, próximas a um fragmento de biomaterial (amarelo). Vistas em perspectiva, a) com o plano xy e b) caixa

com os 3 planos cartesianos, onde é possível ver a conexão entre as células e o material.
Escala: 2,5 μm .

Os resultados obtidos por microCT mostraram que existiam trabéculas parcialmente formadas por fragmentos de SrCHA, e as análises por FIB-SEM evidenciaram isto em uma escala nanométrica. Um biomaterial que ocupe parte significativa de uma trabécula (com segmentos inteiros compostos de biomaterial), como foi observado aqui, pode constituir forte candidato para estudos que objetivam a viabilidade clínica. Até o presente momento, não existem relatos de caracterização tridimensional deste fenômeno na literatura. Ainda, os resultados obtidos aqui podem servir como ponto de partida para trabalhos que analisem a qualidade do osso novo formado na presente deste biomaterial, visando o uso deste material em aplicações clínicas.

6. Conclusões

Neste trabalho utilizou-se as técnicas de imageamento de microCT e FIB-SEM para caracterizar a fragmentação de microesferas de hidroxiapatita nanoestruturadas e cerâmica, 21 dias após a implantação em tíbia de ratos e avaliar os seus efeitos na osteocondução do material e na arquitetura do osso neoformado. O conjunto de materiais analisados constituiu um conjunto propício de amostras para entender se e como a fragmentação do biomaterial, composto por microesferas do polímero alginato contendo nanopartículas de fosfato de cálcio, afeta a arquitetura da rede de trabéculas formadas no reparo ósseo.

Os resultados de SR- μ CT mostraram que a amostra de hidroxiapatita com tratamento térmico (HA) não proporcionou um ambiente favorável à formação de uma rede de trabéculas na região do defeito. Foi possível observar sua osteocondutividade, com finas camadas de mineralização óssea na superfície do biomaterial, e uma modesta formação trabecular em regiões onde houve uma fragmentação considerável das esferas em fragmentos menores. No entanto, esta é uma amostra altamente cristalina, e sua baixa fragmentação fez com que parte substancial do defeito fosse ocupado por biomaterial não fragmentado, constituindo pouca área disponível para adesão celular, ainda após 21 dias, inviabilizando maior crescimento ósseo neste período.

Foi possível verificar que a CHA sintetizada à 5 °C, material amorfo, resultou em um grande aglomerado com superfície irregular, sem conexão alguma com a rede trabecular formada na extremidade do defeito. Neste caso, o biomaterial também impediu o crescimento ósseo na região interna do defeito, por ocupar grande parte do defeito – como na HA –, porém ainda com o agravante de ter formado um grande aglomerado com superfície irregular, comprometendo a osteocondução. Por outro lado, um pequeno fragmento deste biomaterial, desconectado do grande aglomerado, foi encontrado em meio à rede trabecular, o que sugere novamente que o tamanho dos fragmentos resultantes do processo de fragmentação das microesferas impacta diretamente na capacidade do biomaterial conduzir a formação óssea no interior do defeito através de pontes de trabéculas entre o cortical e partes do material. Outrossim, ainda que não fosse o objetivo deste trabalho, a partir dos resultados de microtomografia verificou-se a necessidade de maiores estudos sobre como se dá a

fragmentação das microesferas deste material, visando otimizar sua confecção para futuras aplicações clínicas.

A análise por microtomografia permitiu a caracterização da morfologia da amostra contendo SrCHA na escala micrométrica. Com os resultados obtidos, foi possível identificar que a arquitetura, representada pelos parâmetros relativos aos ângulos 3N, 4N e 5N (abundância de nodos e respectivas distribuições angulares), teve sua estrutura mantida de acordo com os princípios da tensegridade, tal como observado na literatura. Também foi verificado que as trabéculas de SrCHA apresentam espessura média maior que as de CHA sintetizada à 37 °C, observada na literatura, sendo a diferença entre ambas aproximadamente o diâmetro médio observado na maioria dos fragmentos de SrCHA. Por outro lado, a planaridade apresentou diferença significativa quando comparada aos resultados da literatura, o que sugere que esta amostra consiste em um caso singular, onde apesar da arquitetura ser mantida no que se refere à distribuição dos nodos 3N, 4N e 5N, bem como seus respectivos ângulos, a planaridade não é a mesma que a percebida nos estudos da literatura – em osso novo na em defeito de tibia com e sem biomaterial constituído por fosfato de cálcio. Conclui-se, portanto, que o material composto por SrCHA, impregnado na rede trabecular em fragmentos micrométricos e submicrométricos, não afetou significativamente a maioria dos parâmetros avaliados, tendo afetado somente a planaridade dos nodos 3N. Assim, este sistema constitui um possível caminho para entender a hierarquia da organização óssea na escala micrométrica e submicrométrica, representando um possível caso limite no que diz respeito à organização da estrutura trabecular. Trabalhos futuros podem partir desta hipótese, analisando como a arquitetura trabecular é afetada por este material em diferentes tempos de implantação, por exemplo, com as técnicas e metodologia utilizadas neste trabalho, bem como técnicas de caracterização química, como a fluorescência por raios X, que podem caracterizar também como se dá a dispersão de elementos como estrôncio, fósforo e cálcio na região do defeito na escala micrométrica.

No que diz respeito à organização hierárquica do osso, o fato dos ângulos entre nodos ser muito próximo – tanto na SrCHA quanto nos trabalhos da literatura –, sugere que nesta escala hierárquica as estruturas formadas por nodos (3N, 4N e 5N, e suas respectivas distribuições angulares) consistem em módulos hierárquicos da formação da estrutura final,

ainda que existam diferenças no arranjo 3D se observados regiões diferentes de um osso ou ossos diferentes, dada a inclinação do osso trabecular de se rearranjar de acordo com as demandas mecânicas. Considerando isto, levanta-se a possibilidade de que estes módulos hierárquicos sejam, inclusive, anteriores ao parâmetro “planaridade dos nodos 3N”, algo que deve ser tido como linha de pesquisa futura para o melhor entendimento da organização hierárquica nesta escala.

O imageamento por FIB-SEM proporcionou a análise da interface entre o osso neoformado e os fragmentos de biomaterial na nanoscala da amostra de SrCHA. Foi possível verificar a integração entre fragmentos do material e a matriz de tecido mineralizado tanto em uma trabécula encontrada próxima ao osso cortical, quanto em uma trabécula mais nova, encontrada na extremidade do defeito. Em ambos os casos foi possível identificar atividade celular próxima ao biomaterial, tendo sido inclusive possível diferenciar canalículos de osteócitos conectados ao biomaterial e entre si. A série realizada na trabécula mais interna, próxima ao cortical, evidenciou que a maior parte da trabécula era constituída, de fato, pelo próprio material na região analisada, em conformidade com os resultados da microCT. A série obtida da trabécula mais nova, na extremidade do defeito, apresentou um fragmento de biomaterial completamente circundado por tecido mineralizado.

As técnicas de microCT e FIB-SEM se mostraram complementares na análise da SrCHA, possibilitando analisar tridimensionalmente a integração entre fragmentos do biomaterial e o osso novo na escala micro e nanométrica. A metodologia empregada neste trabalho pode ser empregada na avaliação da qualidade de biomateriais voltados para a regeneração óssea.

7. Referências

- ALBREKTSSON, T., JOHANSSON, C., 2001, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration”, *European Spine Journal*, v. 10, pp. 96-101.
- ARAUJO, O., SHARMA, K., DOS SANTOS, C., *et al.*, 2023, “Imaging techniques as tool in the characterization of the impact of silica nanofluid in Indiana limestone”, *X-Ray Spectrometry*, pp. 1-7.
- ARCOS, D., VALLET-REGÍ, M., 2020, “Substituted hydroxyapatite coatings of bone implants”, *Journal of Materials Chemistry B*, v. 8, pp. 1781-1800.
- ATTWOOD, D., SAKDINAWAT, A., 2016, *X-Rays and Extreme ultraviolet Radiation*, 2 ed., Cambridge, Cambridge University Press.
- AWASTHI, S., PANDEY, S., ARUNAN, E., *et al.*, 2021, “A review on Hydroxyapatite coatings for biomedical application: Experimental and theoretical perspectives”, *Journal of Materials Chemistry B*, v. 9, pp. 228-249.
- BATTAFARANO, G., ROSSI, M., MARTINO, V., *et al.*, 2021, “Strategies for bone regeneration: from graft to tissue engineering”, *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 1128 (1-22).
- BENDTSEN, S., QUINNEL, S., WEI, M., 2017, “Development of a novel alginate-polyvinyl alcohol-hydroxyapatite hydrogel for 3D bioprinting bone tissue engineered scaffolds”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 105 (5), pp. 1457-1468.
- BEN-ZVI, Y., REZNIKOV, N., SHAHAR, R. *et al.*, 2017, “3D Architecture of Trabecular Bone in the Pig Mandible and Femur: Inter-Trabecular Angle Distributions”, v. 4, pp. 1-15.
- BERNARDI, S., MACCHIARELLI, G., BIANCHI, S., 2020, “Autologous materials in regenerative dentistry: harvested bone, platelet concentrates and dentin derivates”, *Molecules*, v. 25, p. 5330 (1-10).

BOGHADY, C., KALASHNIKOV, N., MOK, S. *et al.*, 2021, “Revisiting tissue tensegrity: Biomaterial-based approaches to measure forces across length scales”, *APL Bioengineering*, v. 5 (041501), pp. 1-19.

BOUXSEIN, M., BOYD, S., CHRISTIANSEN, B. *et al.*, 2010, “Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography”, v. 25, n. 7, pp. 1468-1486.

BUFFRÉNIL, V., RICQLÈS, A., ZYLBERBERG, L., *et al.*, 2021, *Vertebrate Skeletal Histology and Paleohistology*, Boca Raton, CRC Press.

BUSS, D., KRÖGER, R., MCKEE, M., *et al.*, 2022, “Hierarchical organization of bone in three dimensions: A twist of twists”, *Journal of Structural Biology*, v. 6, 1000057.

BUZUG, T., 2008, *Computed Tomography: From Photon Statistics to Modern Cone-Beam CT*, Lübeck, Springer.

CALASANS-MAIA, M., BARBOZA JR., C., SOUZA, C. *et al.*, 2019, “Microspheres of alginate encapsulated minocycline-loaded nanocrystalline carbonated hydroxyapatite: therapeutic potential and effects on bone regeneration”, *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, 4559-4571.

CALASANS-MAIA, M., MELO, B., ALVES, A. *et al.*, 2015, “Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair”, *Journal of Applied Oral Sciences*, v. 23, n. 6, pp: 599-608.

CALVO, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J., *et al.*, 1997, “Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 63, pp. 125-132.

CAMPIONI, I., PECCI, R., BEDINI, R., 2020, “Ten years of micro-CT in dentistry and maxillofacial surgery: A literature overview”, *Applied Sciences*, v. 10, 4328.

CARMO, A., SARTORETTO, S., ALVES, A. *et al.*, 2017, “Alveolar bone repair with strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite”, *Journal of Applied Oral Science*, v. 26, pp. 1-9.

- CHEN, Y., CHEN, M., HSIEH, D., *et al.*, 202, “Evaluating the bone-regenerative role of the decellularized porcine bone xenograft in a canine extraction socket model”, *Clinical and Experimental Dental Research*, v. 7, pp. 409-418.
- CHOI, A., 2023, *Tissue Repair and Reconstruction: Bone Remodeling and Osseointegration of Implants*, Singapura, Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- CORMACK, A., 1963, “Representation of a function by its line integrals, with some radiological applications”, *Journal of Applied Physics*, v. 34, pp. 2722-2727.
- DIAZ-RODRIGUEZ, P., LÓPEZ-ÁLVAREZ, M., SERRA, J., *et al.*, 2019, “Current stage of marine ceramic grafts for 3D bone tissue regeneration”, *Marine Drugs*, v. 17, pp. 471 (1-16).
- DOS SANTOS, C., MORAES-NETO, C., ARAÚJO, O., *et al.*, 2023, “Elemental characterization of a Puma concolor fossil by non-destructive X-ray techniques”, *X-Ray Spectrometry*, pp. 1-9.
- EINHORN, T., GERSTENFELD, L., 2014, “Fracture healing: Mechanisms and interventions”, *Nature Reviews Rheumatology*, v. 11, pp. 1-10.
- ELLIOT, J., DOVER, S., 1982, “X-ray microtomography”, *Journal of Microscopy*, v. 126, pp. 211-213.
- FELDKAMP, L., DAVIS, L., KRESS, J., 1984, “Practical cone-beam algorithm”, *Optical Society of America*, v. 1 (6), pp. 612-619.
- FERNÁNDEZ, M., WITTE, F., TOZZI, G., 2019, “Applications of X-ray computed tomography for the evaluation of biomaterial-mediated bone regeneration in critical-sized defects”, *Journal of Microscopy*, v. 277, n. 3, pp. 179-196.
- FERNÁNDEZ, M., WITTE, F., TOZZI, G., 2019, “Applications of X-ray computed tomography for the evaluation of biomaterial-mediated bone regeneration in critical-sized defects”, *Journal of Microscopy*, v. 277, n. 3, pp. 179-196.

- FIUME, E., MAGNATERRA, G., RAHDAR, A., *et al.*, 2021, “Hydroxyapatite for Biomedical Applications: A Short Overview”, *Ceramics*, v. 4, pp. 542–563.
- FRATERNALI, F., STEHLING, N., AMENDOLA, A., *et al.*, 2020, “Tensegrity Modelling and the High Toughness of Spider Dragline Silk”, v. 10, pp. 1510 (1-15).
- FULLER, R., APPLEWHITE, E., 1975, *Synergetics: Explorations in the Geometry of Thinking*, Estate of Buckminster Fuller, Macmillan Publishing Co. Inc.
- GONZALEZ, R., WOODS, R., 2018, *Digital Image Processing*, 4 ed., New York, Pearson.
- GUO, L., LIANG, Z., YANG, L., *et al.*, 2021, “The role of natural polymers in bone tissue engineering”, *Journal of Controlled Release*, v. 338, pp. 571-582.
- HABIBOVIC, P., BARRALET, J., 2011, “Bioinorganics and biomaterials: Bone repair”, *Acta Biomaterialia*, v. 7(8), pp. 3013-3026.
- HENKEL, J., WOODRUFF, M., EPARI, D., *et al.*, 2013, “Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective”, *Bone Research*, v. 3, pp. 216-248.
- HOANG, N., THANH, T., SANGPUEAK, R., *et al.*, 2022, “Chitosan nanoparticles-based ionic gelation method: a promising candidate for plant disease management”, *Polymers*, v. 14, pp. 662 (1-28).
- HOU, X., ZHANG, L., ZHOU, Z., *et al.*, 2022, “Calcium Phosphate-Based Biomaterials for Bone Repair”, *Journal of Functional Biomaterials*, v. 13, pp. 187 (1-39).
- HUTMACHER, D., SCHANTZ, J., LAM, C., *et al.*, 2007, “State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective”, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 1, 245-260.
- INGBER, D., 2008, “Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro”, *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, v. 97, pp. 163-179.

INGBER, D., 2023, “From tensegrity to human organs-on-chips: implications for mechanobiology and mechanotherapeutics”, *Biochemical Journal*, v. 480, pp. 243-257.

JANA, S., JANA, S., *et al.*, 2023, *Alginate Biomaterials: Drug Delivery Strategies and Biomedical Engineering*, Singapura, Springer Nature Singapore Pte Ltd.

JIANG, Y., YUAN, Z., HUANG, J., 2019, “Substituted hydroxyapatite: a recent development”, *Materials Technology*, v. 35 (11-12), pp. 785-796.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J., ABRAHAMSOHN, P., 2018, *Histologia Básica: Texto e Atlas*, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan LTDA.

KAMMER, G., SARTORETTO, S., RESENDE, R., *et al.*, 2016, “*In vivo* evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite”, v. 696, pp. 212-222.

KEKLIKOGLOU, K., FAULWETTER, S., CHATZINIKOLAOU, E., *et al.*, 2019, “Micro-computed tomography for natural history specimens: a handbook of best practice protocols”, *European Journal of Taxonomy*, v. 522, pp. 1-55.

KNOX, A., MCGUIRE, A., NATOLI, R., *et al.*, 2020, “Methodology, selection and integration of fracture healing assessment in mice”, *Orthopaedic Research Society*, v. 39, pp. 2295-2309.

KOONS, G., DIBA, M., MIKOS, A., 2020, “Materials design for bone-tissue engineering”, *Nature Reviews*, v. 5, pp. 584-603.

LAMA-ODRÍA, M., VALLE, L., PUIGGALÍ, J., 2022, “Hydroxyapatite Biobased Materials for Treatment and Diagnosis of Cancer”, *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, pp. 11352 (1-35).

LANDIS, E., KEANE, D., 2010, “X-ray microtomography”, *Materials Characterization*, v. 61, pp. 1305-1316.

LARA-OCHOA, S., ORTEGA-LARA, W., GUERRERO-BELTRÁN, C., 2021, “Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug Delivery: Physicochemistry and Applications”, *Pharmaceutics*, v. 13, pp. 1642 (1-24).

LEFEBVRE, V., BHATTARAM, P., 2010, *Current Topics in Developmental Biology*, San Diego, Academic Press.

LI, J., AKEY, A., DUNSTAN, C., *et al.*, 2018, “Effects of Material-Tissue Interactions on Bone Regeneration Outcomes Using Baghdadite Implants in a Large Animal Model”, *Advanced Healthcare Materials*, v. 7, 1800218, pp. 1-9.

LI, Y., YANG, W., LI, X., *et al.*, 2015, “Improving Osteointegration and Osteogenesis of Three-Dimensional Porous Ti6Al4V Scaffolds by Polydopamine-Assisted Biomimetic Hydroxyapatite Coating”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 7, pp. 5715–5724.

LIN, K., CHANG, J., “Structure and properties of hydroxyapatite for biomaterial applications” em MUCALO, M., 2015, *Hydroxyapatite (Hap) for biomedical applications*, Cambridge, Elsevier.

LIRA, R., SARTORETTO, S., PEDROSA, C., *et al.*, 2020, “Is THP-1 viability affected by the crystallinity of nanostructured carbonated hydroxyapatites?”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 7, pp. 1266-1274.

LU, J., YU, H., CHEN, C., *et al.*, 2018, “Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: a review”, *RSC Advances*, v. 8, pp. 2015-2033.

LYONS, J., PLANTZ, M., HSU, W., *et al.*, 2020, “Nanostructured biomaterials for bone regeneration”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. 922, pp. 1-28.

MA, H., FENG, C., CHANG, J., *et al.*, 2018, “3D-printed bioceramics scaffolds: from bone tissue engineering to tumor therapy”, *Acta Biomaterialia*, v. 79, pp. 37-59.

MACHADO, C., SARTORETTO, S., ALVES, A., *et al.*, 2016, “Histomorphometric evaluation of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite as bone substitute in sheep”, *Brazilian Oral Research*, v. 30, n. 1, e45.

MARIE, P., AMMANN, P., BOIVIN, *et al.*, 2001, “Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone”, *Calcified Tissue International*, v. 69, pp. 121-129.

MARTIN, C., 2007, “The importance of radiation quality for optimization in radiology”, *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, v. 3, e38.

MARTINEZ Jr., G., FERREIRA FILHO, J., MIQUELES, E., 2017, “Low-complexity Distributed Tomographic Backprojection for large datasets”, *CNPEM*, pp. 1-8.

MARTINEZ-ZELAYA, V., 2019, *Efeitos de fosfatos de cálcio nanoestruturados na formação e arquitetura óssea*, Tese de D.Sc., CBPF, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MARTINEZ-ZELAYA, V., ARCHILHA, N., CALASANS-MAIA, M. *et al.*, 2021, “Trabecular architecture during the healing process of a tibial diaphysis defect”, *Acta Biomaterialia*, v. 120, pp. 181-193.

MARX, R., 2007, “Bone and bone graft healing”, *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, v. 19, pp. 455-466.

MAVROPOULOS, E., HAUSEN, M., COSTA, A. *et al.*, 2011, “Biocompatibility of carbonated hydroxyapatite nanoparticles with different crystallinities”, *Key engineering Materials*, v. 493-494, pp. 331-336.

MENDOZA-AZPUR, G., FUENTE, A., CHAVEZ, E., *et al.*, 2018, “Horizontal ridge augmentation with guided bone regeneration using particulate xenogenic bone substitutes with or without autogenous block grafts: A randomized controlled trial”, *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 21(4), pp. 189 (1-10).

MIRON, R., GRUBER, R., HEDBOM, E., *et al.*, 2013, “Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts”, *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 15(4), pp. 481-489.

MONFOULET, L., RABIER, B., CHASSANDE, O., *et al.*, 2010, “Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration”, *Calcified Tissue International*, v. 86, pp. 72-81.

MUNIR, M., SALMAN, S., JAVED, I., *et al.*, 2021, “Nano-hydroxyapatite as a delivery system: overview and advancements”, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 49(1), pp. 717-727.

NIINOMI, M., 2019, “Design and development of metallic biomaterials with biological and mechanical biocompatibility”, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 107 (5), pp. 944-954.

ORHAN, K., 2020, *Micro-computed Tomography (micro-CT) in Medicine and Engineering*, 1 ed., Ankara, Springer.

O-SUNG, L., KYUNG, L., YONG, L., 2017, “Comparison of bone healing and outcomes between allogenous bone chip and hydroxyapatite chip grafts in open wedge high tibial osteotomy”, *Clinical Applications of Biomaterials*, v. 28, p. 189.

OTT, S., 2018, “Cortical or trabecular bone: What’s the difference?”, *American Journal of Nephrology*, v. 47, pp. 373-375.

PAIVA, K., MENESES, A., BARCELLOS, R., *et al.*, 2022, “Performance evaluation of segmentation methods for assessing the lens of the frog *Thoropa miliaris* from synchrotron-based phase-contrast micro-CT images”, *Physica Medica*, v. 94, pp. 43-52.

PAWELEC, K., PLANELL, J., 2019, *Bone Repair Biomaterials: Regeneration and Clinical Applications*, 2 ed., Duxford, Woodhead Publishing (Elsevier Ltd.).

PETRIK, V., APOK, V., BRITTON, J., 2006, “Godfrey Hounsfield and the dawn of computed tomography”, *Neurosurgery*, v. 58, pp. 780-787.

PINTO, A., BORIN, G., CARLOS, B., *et al.*, 2022, “Annotat3D: A Modern Web Application for Interactive Segmentation of Volumetric Images at Sirius/LNLS”, v. 35, n. 4, pp. 36-43.

PIRES, A., BIERHALZ, A., MORAES, A., 2015, “Biomateriais: tipos, aplicações e mercado”, *Química Nova*, v. 38 (7), pp. 957-971.

PIRES, J., CARVALHO, J., PEREIRA, M., *et al.*, 2021, “Repair of critical size bone defects using synthetic hydroxyapatite or xenograft with or without the bone marrow mononuclear fraction: A histomorphometric and immunohistochemical study in rat calvaria”, *Materials*, v. 14, p. 2854 (1-13).

QU, H., FU, H., HAN, Z., *et al.*, 2019, “Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review”, v. 9, pp. 26252-26262.

RADON, J., 1917, “Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten”, *Journal of Mathematical Physics*, v. 69, 262-277.

RADON, J., 1986, “On the determination of functions from their integral values along certain manifolds”, *IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING*, v. MI-5, pp. 170-176.

RATNAYAKE, J., MUCALO, M., DIAS, G., *et al.*, 2016, “Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: a review of current trends”, *Journal of Biomedical Material Research*, v. 105(5), pp. 1285-1299.

REDENTE, E., KOPF, K., BAHADUR, A., *et al.*, 2023, “Application-specific approaches to microCT for evaluation of mouse models of pulmonary disease”, *PLoS ONE*, v. 18, e0281452.

REMY, E., THIEL, E., 2002, “Medial axis for chamfer distances: computing look-up tables and neighbourhoods in 2D or 3D”, *Pattern Recognition Letters*, v. 23, pp. 649-661.

REZNIKOV, N., CHASE, H., ZVI, Y. *et al.*, 2016, “Inter-trabecular angle: A parameter of trabecular bone architecture in the human proximal femur that reveals underlying topological motifs”, *Acta Biomaterialia*, v. 44, pp. 65-72.

REZNIKOV, N., SAHAR, R., WEINER, S., 2014, “Bone Hierarchical structure in three dimensions”, *Acta Biomaterialia*, v. 10, pp. 3815-3826.

ROSS, M., PAWLINA, W., 2016, *Histology – A Text and Atlas*, 7 ed., Philadelphia, Wolters Kluwer Health.

ROSSI, A., MOLDOVAN, S., QUERIDO, W., *et al.*, 2014, “Effect of strontium ranelate on bone mineral: Analysis of nanoscale compositional changes”, *Micron*, v. 56, pp. 29-36.

- SANCHES, F., NARDES, R., SANTOS, R., *et al.*, 2023, “Characterization na wooden Pietà sculpture from the XVIII century using XRF and microCT techniques”, *Radiation Physics and Chemistry*, v. 202, 110556.
- SANCILIO, S., GALLORINI, M., NISIO, C., *et al.*, 2018, “Alginate/Hydroxyapatite Based Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Improve Dental Pulp Biomineralization and Differentiation”, *Stem Cells International*, v. 2018, ID 9643721, pp. 1-13.
- SANGEETHA, K., ASHOK, M., GIRIJA, E., *et al.*, 2018, *Ceramics International*, v. 44 (12), pp. 13782-13789.
- SARTORETTO, S., 2018, *O papel da proteína ASC no metabolismo ósseo associada ao uso de diferentes biomateriais*, Tese de D.Sc., UFF, Niterói, RJ, Brasil.
- SARTORETTO, S., CALASANS-MAIA, M., ALVES, A., *et al.*, 2020, “The role of apoptosis associated speck-like protein containing a caspase-1 recruitment domain (ASC) in response to bone substitutes”, *Materials Science and Engineering: C*, v. 112, 110965.
- SCHOFIELD, R., KING, L., TAYAL, U., *et al.*, 2020, “Image reconstruction: Part 1 – understanding filtered back projection, noise and image acquisition”, *Journal of Cardiovascular Computed Tomography*, v. 14, pp 219-225.
- SEARS, D., SEARS, H., EBEL, D., *et al.*, 2016, “X-ray computed tomography imaging: A not-so-nondestructive technique”, *Meteoritics & Planetary Sciences*, v. 51 (4), pp. 833-838.
- SHEPHERD, J., SHEPHERD, D., BEST, S., 2012, “Substituted hydroxyapatites for bone repair”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, pp. 2335–2347.
- SKELTON, R., OLIVEIRA, M., 2009, *Tensegrity Systems*, Dordrecht, Springer.
- STOCK, S., 2020, *Microcomputed Tomography: Methodology and Applications*, 2 ed., Boca Raton, CRC Press.

SU, J., CHEN, X., JING, Y., 2023, *Biomaterials Effect on the Bone Microenvironment: Fabrication, Regeneration and Clinical Applications*, Weinheim, Wiley-VCH GmbH.

ULRICH, D., VAN RIETBERGEN, B., LAIB, A., 1999, “The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone”. *Bone*, v. 25, n. 1, pp. 55-60.

USKOKOVIC, V., USKOKOVIC, D., 2010, “Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents”, *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, v. 96B, pp. 152-191.

VALIENSE, H., BARRETO, M., RESENDE, R., *et al.*, 2015, “In vitro and in vivo evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits”, *Society for Biomaterials*, v. 104B, pp. 274-282.

VÁSÁRHELYI, L., KÓNYA, Z., KUKOVECZ, Á., *et al.*, 2020, “Microcomputed tomography-based characterization of advanced materials: a review”, *Materials Today Advances*, v. 8, 100084.

VENKATESAN, J., BHATNAGAR, I., MANIVASAGAN, P., *et al.*, 2015, “Alginic composites for bone tissue engineering: A review”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, pp. 269-281.

WANG, P., ZHAO, L., LIU, J., 2014, *et al.*, “Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells”, *Bone Research*, v. 2, n. 14017, pp. 1-13.

WEBBER, M., APPEL, E., MEIJER, E., *et al.*, 2016, “Supramolecular biomaterials”, *Nature Materials*, v. 15, pp. 13-26.

WEI, S., MA, J., XU, L., 2020, *et al.*, “Biodegradable materials for bone defect repair”, *Military Medical Research*, v. 7, n. 54, pp. 1-25.

WILLMOT, P., 2019, *An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications*, 2 ed., West Sussex, John Wiley & Sons Ltd.

WINKLER, T., SASS, F., DUDA, G., *et al.*, 2018, “A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering”, *Bone Joint Research*, v. 7, pp. 232-243.

WOPENKA, B., PASTERIS, J., 2005, “A mineralogical perspective on the apatite in bone”, *Materials Science and Engineering C*, v. 25, pp. 131-143.

YI, H., REHMAN, F., ZHAO, C., *et al.*, 2016, “Recent advances in nano scaffolds for bone repair”, *Bone Research*, v. 4, pp. 1-11.

ZHANG, D., WU, X., CHEN, J., *et al.*, 2018, “The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration”, *Bioactive Materials*, v. 3, pp. 129-138.

ZHANG, J., OHSAKI, M., 2015, *Tensegrity Structures: Form, Stability, and Symmetry (Mathematics for Industry Vol. 6)*, Tokyo, Springer Japan.

ZHOU, J., ZHANG, Z., JOSEPH, J., *et al.*, 2021, “Biomaterials and nanomedicine for bone regeneration: Progress and future prospects”, *Exploration*, v. 1, pp. 1-12.

ZHU, L., LUO, D., LIU, Y., 2020, “Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration”, *International Journal of Oral Science*, v. 12, n. 6, pp. 1-15.