UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM PERIODONTIA

**Aplicação da Microtomografia Computadorizada para a
Análise Morfométrica Bi e Tridimensional na Avaliação da
Perda Óssea Experimental em Ratos.**

PATRICIA GARANI FERNANDES

Ribeirão Preto, SP – Brasil.

2014

PATRICIA GARANI FERNANDES

**Aplicação da Microtomografia Computadorizada para a
Análise Morfométrica Bi e Tridimensional na Avaliação da
Perda Óssea Experimental em Ratos.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Taba Júnior

Ribeirão Preto, SP – Brasil

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fernandes, Patricia Garani

Aplicação da Microtomografia Computadorizada para a Análise Morfométrica Bi e Tridimensional na Avaliação da Perda Óssea Experimental em Ratos.

124p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Taba Júnior, Mário

1. Perda óssea na doença periodontal.
2. Microtomografia computadorizada. 3. Método de avaliação de perda óssea do osso alveolar da mandíbula.
4. Estudo em ratos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patricia Garani Fernandes

Aplicação da Microtomografia Computadorizada para a Análise Morfométrica Bi e Tridimensional na Avaliação da Perda Óssea Experimental em Ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor.
Área de Concentração: Periodontia

Aprovado em: ____ / ____ / 2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha amada e querida família

Meus amados pais, Oswaldo e Maria das Graças, vocês são exemplos de dedicação, atenção, cuidado, paciência e amor para com suas filhas. Muito obrigada pelo apoio quando resolvi fazer pós-graduação, pelas palavras de carinho, pelos ensinamentos e pelas lições de vida. O amor incondicional de vocês foi responsável por me dar forças para superar os obstáculos e vencer este desafio. Muito obrigada! Espero sempre poder corresponder às suas expectativas. Amo vocês de todo meu coração.

Renata, minha única irmã, exemplo de garra e superação, você é muito importante para mim. Inspiro-me na sua determinação para seguir em frente. Obrigada pelo incentivo, pelas mensagens de ânimo e pela amizade sincera. Por acompanhar minha trajetória seja com um telefonema carinhoso, uma visita repentina, um cartão postal ou uma mensagem de carinho no celular, eu serei sempre grata a você e a Deus, por ter me dado uma irmã tão maravilhosa.

Ao meu amor

Saulo sua participação foi muito importante em todas as etapas dessa longa caminhada. Obrigada pelo seu apoio, carinho, amor, respeito, pela paciência e dedicação. Nesses cinco anos de convivência nós demos muitas risadas, outras vezes caímos no choro, mas sempre em apoio mútuo e muita perseverança estamos vencendo os obstáculos e juntos vamos seguir em frente, sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus criador de tudo e de todos.

Aos meus pais e à tia Aparecida pelo apoio, incentivo e carinho.

À Renata por ser uma irmã presente, atenciosa e sempre pronta a me ajudar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Taba Júnior, pela orientação, por confiar em mim em todos os momentos, pela convivência amistosa e pela grande oportunidade de aprendizado que me proporcionou.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Periodontia, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior, pela paciência, por ter confiado no meu trabalho e acreditado no meu potencial. Muito obrigada por tudo!

Aos docentes do curso de pós-graduação em Periodontia da FORP-USP, Prof. Dr. Sérgio Luís Scombatti de Souza, Prof. Dr. Márcio Fernando de Moraes Grisi, Prof. Dra. Daniela Bazan Palioto, Prof. Dr. Michel Reis Messoria e Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, pelas oportunidades de trabalho e aprendizado.

À técnica de laboratório e amiga Adriana Gonçalves de Almeida, sem sua contribuição nada disso seria possível, com certeza. Muito obrigada Dri.

A todos os funcionários da FORP que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho, em especial: Tatiana, Dulce, Carla Daniela, Isabel Sola, Regiane Moi, Mary, Paulo Girolineto, Augusto, Vera, Ana Cláudia, Sueli e Daniela da clínica de PG, Isabel Gobbo, Paulo Fazzio, Hermano. Aos técnicos de laboratório e biotério: Sebastião, Mila, Fabiola, Serginho, Aline, Massaro.

Ao meu querido amigo Adriano Henrique Pinheiro pelos anos de amizade, lealdade, companheirismo e apoio, por tantas conversas, mensagens, telefonemas e conselhos sempre oportunos.

À Solena, amiga para todas as horas e de tantas jornadas. Exemplo de dedicação ao trabalho, aos amigos e à família. Uma grande amizade que com certeza ultrapassa a distância e o tempo.

Aos meus queridos amigos de colégio Bom Jesus (impossível citar todos os nomes) pelos bons momentos vividos, pelas risadas proporcionadas e pela amizade duradoura alicerçada na confiança, carinho e companheirismo.

À turma de Odontologia de 2001 - UFPR. Obrigada aos amigos pelos quatro anos de convívio diário e por tantos bons momentos passados juntos.

Aos meus amigos da especialização em Periodontia turma de 2005 e aos professores e mestres da Universidade Estadual de Londrina.

Aos amigos da minha turma de Doutorado, Danilo e Luciana, pelos anos de convívio, companheirismo e aprendizado.

Aos amigos da turma de Mestrado 2011- Cristine, Mariana, Kelly, Paula, Felipe, Túlio, André. Vocês tiveram participação especial nesta longa caminhada. Obrigada a todos, sem distinção.

Aos amigos da turma de Doutorado 2012 Carol Delmondes, Carol Mandetta, Gustavo e Umberto. Obrigada pelo apoio em vários momentos, pela ajuda com gráficos, tabelas, pelo auxílio com os pacientes e com os animais de laboratório. Cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração.

Aos amigos da pós-graduação durante esses seis anos que aqui passei: Patrícia Freitas, Andréa, Rafael, Guilherme, Raquel, Luciana Bastos, Priscila Paganini, Priscila Nóbrega, Flávia, Adriana pela convivência diária na clínica, pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade.

A todas as minhas companheiras de moradia nesses cinco anos: Adriana, Luciana, Gislaine, Marina, Sarah, Karina, Larissa, Mariana, Renata e “agregadas”. Juntas nós formamos uma grande família com direito a muitas conversas, conselhos, bilhetes, momentos de alegrias e de tristezas que foram importantes para meu crescimento pessoal. Obrigada por cada momento compartilhado, guardarei com carinho nossa amizade e sempre as levarei em meu coração.

À Renata Spagolla por ser uma pessoa querida, companheira, amiga e por fazer parte da minha vida num momento tão importante e decisivo. Obrigada de coração.

Ao amigo Lucas Novaes pela amizade, apoio, conselhos, pela ajuda com photoshop e pelos vídeos engraçados compartilhados.

À amiga Viviane Mariguela e ao amigo Mario Lisboa pelas conversas, pelo carinho, apoio, incentivo e abraços apertados.

À família Miranda e a todos os amigos de Alvo, pelo apoio nos momentos de angústia e tristeza, sempre me ajudando a vencer os obstáculos.

À família Abouchedid pelo carinho com que me acolheram, pelo apoio incondicional, pela amizade que construímos e por todos os momentos juntos.

Ao querido amigo e incentivador João Moura Neto pela amizade, pelo apoio em todas as horas difíceis, pelo abraço apertado. Sua garra e empreendedorismo são motivos de inspiração para mim.

Aos amigos da Clinface. Obrigada pelo carinho e por vocês sempre torcerem pelo meu sucesso profissional.

À psicóloga Vera Otero pelas palavras certas, pelo apoio e por sua generosidade.

A todos os amigos e familiares que torceram por mim e pelo meu sucesso. Sem o apoio de vocês esse trabalho não seria possível. A caminhada é longa e a jornada árdua, mas com perseverança e garra eu hei de vencer todos os desafios.

Muito obrigada de coração!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D: bidimensional.

3D: tridimensional

SHR: *Spontaneously Hypertensive Rat*

WK: Rato Wistar Kyoto

Micro CT: microtomografia computadorizada

μCT: micro-CT

DP: doença periodontal

C: controle

mm: milímetro

μm: micrômetro

M1: primeiro molar mandibular

M2: segundo molar mandibular

JCE: junção cimento esmalte

COA: crista óssea alveolar

COV: crista óssea vestibular

COL: crista óssea lingual

COL: crista óssea interproximal

POA: perda óssea alveolar

VOI: volume ósseo de interesse

ROI: região óssea de interesse

CT-Analyser (CTAN): Software de Análise Morfométrica

DMO: Densidade Mineral Óssea

TC: Tomografia Computadorizada

BS: Área superficial das trabéculas ósseas

BV: Volume ósseo da amostra

BV/TV: Razão entre o volume ósseo e o volume da amostra

BS/BV: Razão entre a área óssea da amostra e o volume ósseo da amostra

BS/TV: Razão entre o volume ósseo da amostra e o volume total da amostra

TS: Área superficial da amostra óssea

Tb. N: Número Trabecular

Tb. Sp: Separação Trabecular

Tb. Th: Espessura Trabecular

TV: Volume Total da Amostra

Mp: Mega pixel

NRECON® = Software usado para reconstruir imagens de seção transversal a partir de imagens de projeção tomográfica

CTAN® = Software de Análise Morfométrica

DATA VIEWER® = Software de Visualização Morfométrica

CTVOX® = Software para visualização e manuseio das imagens tridimensionais

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA.....	1
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Animais	19
3.1.1. Divisão dos grupos	19
3.1.2. Registro da pressão arterial	20
3.1.3. Indução da doença periodontal experimental	21
3.1.4. Remoção da ligadura	22
3.1.5. Eutanásia e coleta de material	23
3.2. Microtomografia computadorizada	23
3.2.1. Análise das medidas unidimensionais	28
3.2.2. Análise das medidas volumétricas.....	29
3.3. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Medidas lineares.....	38
4.2. Medidas volumétricas	44
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8. ANEXO.....	84
9. APÊNDICE.....	89

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A doença periodontal é caracterizada por um processo inflamatório que culmina na destruição dos tecidos de suporte dos dentes (a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar). Um crescente corpo de evidências tende a demonstrar que as interações microbianas entre as diferentes espécies bacterianas são fatores importantes na patogenia da doença periodontal, além da resposta do hospedeiro frente a essa agressão (Baker, 2000; Ali et al., 2011).

Diversos métodos podem ser utilizados para medir a perda óssea alveolar decorrente da periodontite, dentre eles: as técnicas de morfometria (uma técnica simples e eficiente na qual a medição da distância entre a junção cimento-esmalte [JCE] à crista óssea alveolar [COA] se dá via captura das imagens e avaliação destas por meio de um programa de análise de imagens), os exames radiográficos (análise de perda óssea pela visualização das estruturas duras [JCE e COA] e sua relação de proximidade ou perda) e a análise de dados histológicos (observação dos tecidos mineralizados e não-mineralizados por meio de lâminas de histologia). A observação de tecidos ao microscópio óptico é feita por transparência. É necessário que o tecido seja submetido a cortes finíssimos, para que possibilite sua inclusão num bloco de parafina, para ser cortado num micrótomo; depois de cortado, retirada a parafina e colocado numa lâmina, a amostra é fixada e corada. As lâminas coradas podem ser finalmente observadas ao microscópio óptico, pela microscopia eletrônica ou ainda pela imunofluorescência (Lindhe et al., 2003; Wilkie et al., 2004; Trisi et al., 2006; Vanderlei et al., 2012;).

No entanto, esses métodos proporcionam apenas informações bidimensionais (2D), pois estes medem a perda óssea horizontal (no sentido mesio-distal ou vestibulo-lingual) portanto existem limitações de precisão e sendo assim, não tem a capacidade de produzir dados sobre as três dimensões (3D). Nessas análises, mudanças intra-ósseas que podem ocorrer durante a infecção periodontal podem não ser quantificadas.

Com o intuito de proporcionar uma melhor visualização da estrutura óssea trabecular, mas sem a necessidade de destruição da amostra, muitos estudos procuraram métodos alternativos que pudessem fazer esta quantificação (Genant et al., 1996; Slyfield et al., 2012). A microtomografia computadorizada (micro-CT) pode ser uma alternativa mais sensível para medir a massa óssea e a microestrutura do osso alveolar quando comparada aos métodos convencionais consolidados (Bouxsein et al., 2010; Molon et al., 2013). Por se tratar de uma técnica não destrutiva que fornece imagens de alta resolução espacial em 3D em um nível micrométrico, permite a reorientação auxiliada por computador seguindo a digitalização de imagens, garantindo assim um alinhamento quase idêntico ao real. Assim a micro-CT (μ CT) consegue mostrar pequenas alterações tanto nos defeitos infraósseos periodontais bem como nos casos de perda óssea alveolar (Feldkamp et al., 1989; Park et al., 2007).

As imagens tridimensionais representam muito bem uma imagem bidimensional correspondente, obtida com a microscopia, por exemplo. Estudos sobre a confiabilidade e precisão de radiografias bidimensionais demonstraram diferenças de até 25% entre os cálculos de quantificação do osso alveolar de radiografias em 2D quando comparadas com imagens em 3D (Fernandes et al., 2007; Ebina et al., 2009; Ferrare et al., 2013). As vantagens desta técnica podem ser

enumeradas de acordo com os seguintes itens: facilidade de escolha da região a ser avaliada sem a necessidade de preparação da amostra, sem interferência de manchas ou artefatos e sem corte fino - uma única varredura da imagem 3D apresenta a estrutura completa da amostra em alta resolução, além de se obter a amostra intacta de volta ao final do escaneamento (De Smet et al., 2006; Chackartchi et al., 2011).

Em longo prazo, acredita-se que a análise morfométrica da ultraestrutura de fenótipos e o estudo das relações entre os fenótipos de ossos em diferentes níveis de hierarquia, abrirão novas perspectivas na avaliação da qualidade do osso. (Schneider et al., 2007).

Assim, a utilização da μ CT tem sido amplamente divulgada para estudar o metabolismo ósseo em modelo com animais, e constitui uma nova forma para avaliar estruturas de tecidos duros, em 3D. As análises utilizando micro-CT de alta resolução podem ser usadas para construir um modelo de osso em 3D e também para analisar os dados de uma forma altamente precisa e não destrutiva.

RESUMO

RESUMO

Introdução: A histomorfometria do osso é um dos métodos padronizados que pode ser utilizado para quantificar a microestrutura do osso trabecular. Existem muitos meios de acesso para conseguir a visualização dos defeitos ósseos no caso de um acometimento de doença periodontal, por exemplo. A extensão e morfologia da perda óssea alveolar podem ser acessadas e examinadas após confecção de retalhos mucoperiosteais em cirurgias periodontais ou através de exames radiográficos. A partir de então, a tecnologia da micro-CT tornou-se padrão ouro para avaliação da arquitetura 3D do osso trabecular; exibindo como uma de suas principais vantagens sua habilidade em proporcionar resultados quantitativos com pouco ou nenhum preparo da amostra e sem a sua destruição.

Metodologia: Foram utilizados 40 ratos machos: ratos normotensos (WK) e espontaneamente hipertensos (SHR) foram divididos em grupos com doença periodontal induzida por ligaduras (DP), e grupos controle, em que a DP não foi induzida (C). Cada um desses quatro grupos foram divididos em 2 subgrupos, de acordo com o período de eutanásia, que foi realizada no 10º e no 21º dia do experimento, desse modo cada grupo teve um n=5. Os animais do grupo DP receberam ligadura com fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior. Após a eutanásia todas as hemimandíbulas dos animais tiveram seu tecido mole removido através de processos químico e biológico a fim de proporcionar uma peça histológica preparada adequadamente para ser escaneada no microtomógrafo. Para realização da análise microtomográfica foi utilizado um aparelho modelo 1172 da fabricante SkyScan®. As amostras foram verificadas nos três planos espaciais através dos softwares CTAN®, DATA VIEWER® e CTVOX® que também foram utilizados para a visualização tridimensional, análise qualitativa e quantitativa da anatomia externa e interna do osso alveolar.

Resultados: Os resultados das medidas lineares foram aqueles extraídos de uma imagem bidimensional de uma fatia única escolhida por ser a mais representativa para detectar a perda óssea alveolar. Para a quantificação dos parâmetros volumétricos foi realizada a avaliação em dois pontos distintos: a área da região de furca do M1 mandibular e a área da região interproximal entre M1 e M2 da mandíbula. De todos os parâmetros avaliados e analisados os mais representativos para detectar a perda óssea alveolar neste modelo de estudo foram: Furca e JCE-COV (junção cimento-esmalte – crista óssea vestibular) em 2D (medidas lineares) e a relação entre a superfície óssea e o volume ósseo; relação entre o volume ósseo e o volume total; porosidade e densidade mineral óssea nos parâmetros em 3D (medidas volumétricas).

Conclusão: A metodologia empregada mostrou ser eficiente para a caracterização da perda óssea alveolar nos grupos controle e doença periodontal. A região escolhida e o método de análise tem influência no resultado. Assim medidas lineares e medidas volumétricas de uma mesma amostra podem apresentar porcentagens diferentes em relação à perda óssea.

Palavras-chave: análise morfométrica bi e tridimensional, microtomografia computadorizada, avaliação de perda óssea alveolar da mandíbula, doença periodontal induzida em ratos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: The histomorphometry of bone is one of the standard methods that can be used to quantify the microstructure of the trabecular bone. There are many ways to get access to the visualization of bone defects in the case of onset of periodontal disease, for example. The extent and morphology of alveolar bone loss may be accessed and examined after making mucoperiosteal flaps in periodontal or through radiographic examinations surgeries. Since then, the technology of micro - CT has become the gold standard for evaluation of the 3D architecture of trabecular bone; showing as one of its main advantages its ability to provide quantitative results without destruction and with little or no sample preparation.

Methodos: Normotensive rats (WK) and spontaneously hypertensive (SHR) were divided into groups of ligature-induced periodontal disease (PD), and control groups (C), where PD is not induced. 40 rats were used and each of these four groups were divided into 2 subgroups according to the time of euthanasia, which was held on the 10th and 21st day of the experiment, thus each group had an $n = 5$. The animals in the PD group received ligature with cotton thread around the first molar. After euthanasia, all animals had their mandibles soft tissue removed through chemical and biological processes to provide a suitably prepared for micro-ct analysis. In order to perform the micro-CT analysis, a model 1172 device manufacturer of SkyScan® was used. The samples were observed in the three spatial planes through the CTAN®, DATA VIEWER® and CTVOX® softwares which were also used for three-dimensional visualization, qualitative and quantitative analysis of the external and internal anatomy of the alveolar bone.

Results: The results of linear measurements were those extracted from a twodimensional image of a single slice chosen for being the most representative for detecting bone loss. For quantification of the volumetric parameters were assessed at two different points: the area of the furcation region of the mandibular M1 and interproximal area of the region between M1 and M2 of the jaw. Of all the most representative in detecting alveolar bone loss in this model of study parameters were evaluated and analyzed: Furcation and cementum-enamel junction to the buccal bone crest = 2D (linear measurements) and the relationship between the bone surface and bone volume; ratio of bone volume to the total volume; porosity and bone mineral density in 3D parameters (volumetric measurements).

Conclusion: The methodology was efficient for the characterization of alveolar bone loss in the periodontal disease groups. The region chosen and method of analysis have affected the outcome. Thus, linear and volumetric measurements of the same sample may have different percentages in relation to bone loss.

Keywords: bi e three-dimensional morphometric analysis, computed microtomography, evaluation of alveolar bone loss, induced periodontal disease, study in rats

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma infecção polimicrobiana iniciada e mantida por microorganismos presentes no biofilme dental e é caracterizada inicialmente pela inflamação gengival, sangramento à sondagem na área da bolsa gengival, diminuição da resistência dos tecidos periodontais à sondagem (bolsa periodontal), perda de inserção gengival e se não for tratada adequadamente pode evoluir para a perda do osso alveolar (Löe et al., 1992).

O osso alveolar é uma parte especializada dos ossos da mandíbula e da maxila, que forma a estrutura de suporte principal para os dentes. Embora fundamentalmente comparável a outros tecidos do osso no corpo, o osso alveolar é submetido à remodelação contínua e rápida, associada com a erupção dos dentes e, subsequentemente, às exigências funcionais da mastigação. A capacidade do osso alveolar, de se submeter à remodelação rápida também é importante para adaptação posicional dos dentes, mas por outro lado pode ser prejudicial para a progressão da doença periodontal. A complexidade geométrica dos dentes multirradiculados no osso alveolar, a resposta desse tecido à mastigação e a outras forças dentro da cavidade oral, resultam num padrão complexo de remodelação óssea. A organização ultraestrutural da matriz óssea e consequentemente, a compreensão dos eventos moleculares que regulam a formação e remodelação dos tecidos ósseos é de fundamental importância no desenvolvimento de modalidades de tratamento para contornar ou corrigir anomalias estruturais e funcionais (Sodek & McKee, 2000).

A histomorfometria do osso é um dos métodos padronizados que pode ser utilizado para quantificar a microestrutura do osso trabecular. Recentemente, foram

delineados novos parâmetros para melhorar a quantificação histomorfométrica da microestrutura trabecular. Entretanto, estes têm sido limitados à análise bidimensional.

Existem muitos meios de acesso para conseguir a visualização dos defeitos ósseos no caso de um acometimento de doença periodontal, por exemplo. A extensão e a morfologia da perda óssea alveolar podem ser acessadas e examinadas após confecção de retalhos mucoperiosteais em cirurgias periodontais ou através de exames radiográficos. O diagnóstico precoce de pequenas alterações ósseas alveolares, decorrentes de processos patológicos como periodontite e lesões periapicais, ou devido a tratamento regenerativo, requer métodos de diagnóstico precisos e sensíveis. Com o advento da microtomografia computadorizada é possível avaliar mudanças dinâmicas na espessura do ligamento periodontal e na remodelação óssea alveolar de forma clara e precisa. (Ferrare et al., 2013)

Xu et al. (2013) observaram mudanças significativas na espessura do ligamento periodontal e uma pobre recuperação da espessura desse ligamento durante o período experimental no modelo de estudos em ratas ovariectomizadas. A fração do volume ósseo aumentou, a separação trabecular diminuiu significativamente e a perda óssea foi observada claramente. Os autores puderam demonstrar que a microtomografia computadorizada possibilitou analisar o colapso da microestrutura da rede do osso trabecular e a evidente perda de massa óssea.

O osso é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo no qual a matriz extracelular é mineralizada conferindo rigidez e força ao esqueleto, mas mantendo certo grau de elasticidade. Sua composição pode ser separada em uma matriz orgânica, composta quase que totalmente por colágeno (95% colágeno tipo I e quase 5% colágeno tipo V), e uma matriz inorgânica, formada basicamente de

cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita. Em conjunto com o cimento radicular e o ligamento periodontal, o osso alveolar constitui o aparelho de inserção dos dentes, cuja função principal é distribuir e absorver as forças geradas, por exemplo, pela mastigação e por outros contatos dentários.

A estrutura anatômica do osso alveolar é bastante complexa, desse modo, ela é constituída de um tipo de osso com inserção colágena, que é formado por camadas com uma orientação paralela à direção coronal-apical do dente. A esta inserção de fibras colágenas pertencem as fibras de Sharpey que se estendem obliquamente de uma fina lamela de osso que reveste a parede interna do alvéolo e são contínuas com as fibras do ligamento periodontal. A camada externa mais espessa de osso formado de placas corticais se prolonga desde o osso da mandíbula para formar as superfícies lingual e vestibular do processo alveolar que é em grande parte composta internamente de osso esponjoso (Sodek e McKee, 2000).

Tanto o osso cortical quanto o esponjoso sofrem constante remodelação (reabsorção seguida de formação) em resposta à movimentação fisiológica ou não dos dentes e às mudanças nas forças funcionais que agem sobre os dentes.

Doenças periodontais são doenças inflamatórias crônicas que eventualmente podem levar à perda das estruturas de suporte dos dentes, incluindo a reabsorção do osso alveolar dos maxilares. Essa é a doença mais prevalente das doenças ósseas que atingem o ser humano, sendo bastante severa para permitir a perda dos dentes em cerca de 10 a 15% dos adultos (Baker, 2000). É também doença infecciosa associada ao crescimento subgengival de certas espécies anaeróbias facultativas, as bactérias gram-negativas. Muitos dos danos gerados pelas infecções bacterianas, não se tratam apenas de fatores de virulência, mas sim da resposta do

hospedeiro frente a essa agressão podendo resultar até em severa perda óssea alveolar (Baker, 2000).

A microtomografia computadorizada é uma técnica não destrutiva que reconstrói e modela interiores de amostras na escala micrométrica e obtém informações sobre sua geometria tridimensional e propriedades do material. O conceito básico desse processo de imagem provou que um objeto tridimensional pode ser reconstruído através de suas projeções bidimensionais (Argenta MA et al., acessado em 2013).

A utilização da microtomografia computadorizada (micro-CT ou μ CT) para análise tridimensional da estrutura óssea *in vitro* foi primariamente introduzida por Feldkamp et al. (1989). Os autores descreveram o novo método baseados na alta resolução da tomografia computadorizada onde uma matriz de reconstrução tridimensional foi criada diretamente por meio de uma série de cortes bidimensionais. Todos os índices estruturais normalmente determinados a partir de seções histológicas bidimensionais puderam ser obtidos de forma não destrutiva a partir de um grande número de fatias em cada uma das três direções ortogonais. Isto permitiu uma descrição detalhada da variação estrutural dentro de um espécime e facilitou enormemente o estudo da anisotropia estrutural. Assim os autores puderam afirmar que o método teria potencial para superar muitas das limitações das atuais abordagens para o estudo da arquitetura do osso a nível microscópico. Nesse trabalho os autores desenvolveram um novo método para o exame direto da estrutura óssea tridimensional *in vitro*, enfatizando sua aplicação ao osso esponjoso, no entanto o método também pode ser usado para o estudo do osso cortical.

A partir de então, esta tecnologia tornou-se padrão ouro para avaliação da arquitetura 3D do osso trabecular; exibindo como uma de suas principais vantagens sua habilidade em proporcionar resultados quantitativos sem destruição e com pouco ou nenhum preparo da amostra.

Em um estudo de Seto et al. (2008) foram examinados os efeitos da sinvastatina *in vitro* utilizando células de calvária de ratos em cultura e *in vivo*, utilizando ratos com periodontite induzida por ligaduras. Nesse estudo os autores revelaram a destruição dos tecidos periodontais, mostrando uma diminuição da espessura da camada epitelial e inserção irregular das fibras de colágeno no grupo com ligaduras. Em contrapartida, a quantidade de osso alveolar tinha aumentado no grupo tratado com sinvastatina e os resultados histológicos confirmaram os resultados obtidos por análise de microtomografia computadorizada, demonstrando assim a validade do método de análise por imagem.

Nos anos recentes tem crescido enormemente o uso de imagens obtidas através da microtomografia computadorizada de alta resolução para medir e/ou avaliar a morfologia óssea trabecular e cortical tanto em estudos em modelo animal como em humanos. Existem diversos sistemas disponíveis comercialmente e como resultado disto, existem várias abordagens para conseguir a aquisição das imagens, realizar a avaliação destas e interpretar os resultados obtidos. (desse modo a falta de consistência torna difícil a interpretação correta dos dados e a comparação dos achados entre diferentes estudos).

Britz et al. (2010) demonstraram por meio de um estudo em tíbia de ratos, que é possível visualizar e quantificar a porosidade da cortical óssea em ratos usando um aparelho disponível no mercado (SkyScan 1172 - Aartselaar, Belgium) e eles

puderam validar seus resultados comparando com a análise histológica convencional.

Como esperado, alguns autores puderam observar uma forte correlação entre histomorfometria 2D tradicional e análise 3D por meio da μ CT de biópsias de crista ilíaca em humanos. Fortes relações entre as avaliações 2D e 3D de biópsias da crista transilíaca e entre scans HR-pQCT (alta resolução periférica quantitativa em tomografia computadorizada) do rádio e da tíbia, foram encontradas e a mais forte correlação foi vista entre a biópsia e parâmetros HR-pQCT, especificamente entre BV / TV, Tb.N e Tb.Sp medido pela μ CT (Cohen et al., 2010).

A qualidade óssea é clinicamente monitorada pela medida da densidade mineral óssea (DMO), mas esta medida não é suficiente para identificar completamente a fragilidade óssea e o risco de fratura de um indivíduo. A medida de parâmetros micro estruturais, denominada de análise morfométrica bidimensional (2D) e tridimensional (3D), deve ser incorporada ao monitoramento da qualidade óssea para uma determinação mais precisa dessa qualidade e para o aprimoramento do estudo do trabeculado ósseo (Silva, 2009).

Considerando a importância deste tema, este trabalho teve como objetivo promover uma nova abordagem quanto à análise morfométrica que pode ser realizada lançando uso da microtomografia computadorizada e os aspectos que devem ser levados em consideração desde a construção até a obtenção das imagens 2D e 3D. Este estudo desenvolveu um método de medição específico no qual foram feitas as medidas morfométricas 2D e 3D por meio da microtomografia computadorizada, para comparação e avaliação da perda óssea em doença periodontal induzida em ratos.

OBJETIVO

2. OBJETIVOS

O objetivo primário do presente trabalho foi descrever o passo-a-passo de aplicação da microtomografia computadorizada para a avaliação da perda óssea alveolar em um modelo experimental animal.

O objetivo secundário foi comparar os parâmetros 2D e 3D e avaliar a precisão do método microtomográfico em modelo experimental de perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos por meio da microtomografia computadorizada.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 40 ratos machos neste experimento, sendo 20 normotensos da raça Wistar Kyoto (WK) e 20 hipertensos da raça SHR = *Spontaneously Hypertensive Rats*, com aproximadamente 10 – 12 semanas de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP), sendo a cepa original da Taconics Pharm. Inc. Germantown. É importante ressaltar que a relação entre hipertensão e perda óssea decorrente da doença periodontal não será avaliada e correlacionada neste estudo.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas de dimensões 41 x 34 x 16 cm, em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada (22-25°C) no biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP. Eles seguiram uma alimentação com dieta laboratorial padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas regidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e submetidos à aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Instituição (Protocolo nº 10.1.379.53.2).

3.1.1. Divisão dos grupos:

Os ratos WK e SHR foram divididos em grupos com doença periodontal induzida por ligaduras (DP), e grupos controle, em que a DP não foi induzida (C). Cada um desses 4 grupos foram divididos em 2 subgrupos, de acordo com o

período de eutanásia, que foi realizada no 10° e no 21° dia do experimento constituindo as seguintes situações:

WK + DP ratos normotensos com doença periodontal (n=10);

WK+DP com eutanásia no 10° dia (n=5)

WK+DP com eutanásia no 21° dia (n=5)

WK+C ratos normotensos sem doença periodontal (n=10);

WK+C com eutanásia no 10° dia (n=5)

WK+C com eutanásia no 21° dia (n=5)

SHR+DP ratos hipertensos com doença periodontal (n=10);

SHR+DP com eutanásia no 10° dia (n=5)

SHR+DP com eutanásia no 21° dia (n=5)

SHR+C ratos hipertensos sem doença periodontal (n=10);

SHR+C com eutanásia no 10° dia (n=5)

SHR+C com eutanásia no 21° dia (n=5)

3.1.2. Registro da pressão arterial:

A pressão arterial dos animais foi verificada através do método indireto de pletismografia de cauda, utilizando-se um pletismógrafo adaptado para ratos. Os registros foram realizados por um único operador, no período da manhã, no início do

experimento (antes da colocação da ligadura) e, depois, semanalmente, até o momento da eutanásia dos animais. Este registro da pressão arterial foi realizado em laboratório específico com controle de luminosidade e ruídos para evitar o estresse dos animais. Assim sendo, foram considerados hipertensos apenas os animais que apresentaram pressão arterial superior a 150 mmHg sob as condições supracitadas.

3.1.3. Indução da Doença Periodontal Experimental com Ligadura

Para a colocação da ligadura nos grupos DP, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal, com solução de Cloridrato de Xilazina a 2% (2mg/ml) (Rompum - Bayer Saúde Animal) e Cloridrato de Ketamina a 10% (10mg/ml) (Dopalen - Agribands - Brasil Ltda) nas respectivas doses de 8 mg/Kg (Xilazina) e 75mg/Kg (Ketamina). Após a anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes posteriores da mandíbula.

Com o auxílio de uma sonda exploradora odontopediátrica (Hu-Friedy, Chicago, USA) para efetuar o espaço adequado para inserção do fio e com a ajuda do porta-agulha tipo castroviejo (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil) o fio de algodão foi colocado ao redor dos primeiros molares inferiores de cada animal (Fig. 1A e 1B). Periodicamente, foram verificados o peso corpóreo e a presença das ligaduras nos animais. Quando constatada a perda da ligadura antes do período de indução e manutenção da doença, um novo animal era preparado para o estudo e então substituído.

Figura 1. A. Colocação do fio de algodão ao redor do primeiro molar mandibular com auxílio de porta-agulha e pinça adequados. **B.** Ligadura instalada.

3.1.4. Remoção da Ligadura

Com a intenção de avaliar o reparo ósseo, alguns animais tiveram suas ligaduras removidas antes da eutanásia. Dessa forma, no 10º dia após a indução da DP por ligadura, metade dos animais de cada grupo (WK+DP e SHR+DP) foi submetida à eutanásia bem como metade dos animais do grupo controle (WK+C e SHR+C). A outra metade teve a ligadura removida no 10º dia e a eutanásia ocorreu

no 21º dia do experimento, tanto dos animais do grupo DP quanto dos animais do grupo C.

3.1.5. Eutanásia e coleta de material para as devidas análises

Os animais foram submetidos à eutanásia sob anestesia geral com solução final de Cloridrato de Xilazina 2% (8mg/Kg) (Dopaser – Herpate Calier, Juatuba-MG, Brazil) e Cloridrato de Ketamina 10% (75mg/Kg) (Agener – São Paulo-SP Brazil), nas respectivas doses de 30 mg/Kg (Xilazina) e 240 mg/Kg (Ketamina), de acordo com o período de eutanásia de cada grupo, isto é, 10 ou 21 dias.

As hemimandíbulas foram dissecadas através de processos químico e biológico e as peças anatômicas obtidas foram acondicionadas individualmente em potes plásticos identificados, contendo solução de formalina neutra tamponada 10%, a fim de proporcionar uma peça histológica adequadamente preparada para ser escaneada no microtomógrafo.

3.2. Microtomografia computadorizada

A Tomografia Computadorizada (TC) é uma técnica que permite a visualização de secções transversais (cortes internos) de um objeto de forma não destrutiva. O princípio de funcionamento do microtomógrafo de raios-X baseia-se na propriedade dos materiais absorverem esta radiação de forma diferenciada dependendo de sua composição química e densidade. A TC divide virtualmente o objeto de estudo em “fatias” nas quais são mapeados parâmetros físicos como a densidade e a porosidade de cada região interna do objeto que são apresentadas na forma de imagens bidimensionais que podem ser compostas de modo a obter

objetos virtuais 3D, por meio de algoritmos computacionais. No caso de ossos, pode-se estudar a estrutura trabecular, verificar a existência de processos de osteopenia ou osteoporose e medir a densidade óssea. A obtenção das imagens tomográficas (secções transversais) é realizada em duas etapas:

- a) aquisição das imagens radiográficas de diversas projeções angulares da amostra ao longo de uma rotação de 180° ou 360° com passos de rotação muito precisos (alguns décimos de graus);
- b) reconstrução das imagens das secções transversais a partir das imagens das projeções angulares por meio do algoritmo de reconstrução de feixe cônico de Feldkamp modificado que roda no *cluster* de computadores. Este processo de reconstrução cria uma completa representação 3D da microestrutura interna do objeto.

Para realização da análise microtomográfica foi utilizado um aparelho modelo 1172 (Fig. 1A do Anexo) da fabricante SkyScan® (SKYSCAN N.V., Kontich, Belgium). As amostras foram verificadas em todos os três planos espaciais através do aparelho modelo 1172 versão 1.5, composto por um tubo de raios-X de microfoco com fonte de alta tensão (100 kV), um porta-amostra com manipulador de precisão e um detector baseado em uma câmera CCD de 11Mp (4000 x 2300 *pixels*) conectados a um computador de controle e aquisição de dados (*host*) interligado em rede a um *cluster* de computadores utilizados na reconstrução das imagens.

O escaneamento das amostras foi padronizado com um tamanho de *voxel* isotrópico de 9 μm , 60 kV, 165 μA , em 180° , ângulo de rotação de 0.6 e filtro de Al 0,5 mm com tempo de exposição de 540 milissegundos ou seja 0,5 segundos, utilizando um filtro de alumínio de 0.5 mm de espessura. As imagens de cada amostra foram reconstruídas a partir do ápice da coroa, incluindo o processo do

osso alveolar com o software específico NRECON® v 1.6.3.3 em cerca de 100 a 120 fatias de acordo com os parâmetros anatômicos adotados. Os softwares CTAN® v 1.10.11.0 e DATA VIEWER® v 1.4.3 e CTVOX® v 2.0.0.0 foram utilizados para a visualização tridimensional e a análise qualitativa (quantitativa também) da anatomia externa e interna dos dentes e do osso alveolar. A gama completa de softwares para análise quantitativa SkyScan® 2D / 3D e visualização em 3D permitiu que cada hemi-mandíbula de cada um dos grupos fossem examinadas pelo sistema de aplicativos e softwares fornecidos pela SkyScan®.

As peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostra (Fig. 1B do Anexo) apropriado para o equipamento, com certa utilidade, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento. Após o escaneamento, as projeções tomográficas foram reconstruídas com o auxílio de um programa específico (N.Recon®, SkyScan®). Este programa gerou as imagens em 3D. O programa DataViewer® foi utilizado para visualização e avaliação em 2D (medidas lineares) dos eixos coronal, transaxial e sagital bem como a definição da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea nos aspectos vestibular e lingual dos dentes, e da região interproximal e de furca. A posição da crista óssea alveolar foi determinada como o primeiro contato do osso com a superfície radicular.

As análises lineares (2D) foram realizadas após o estabelecimento de uma posição ideal, determinada pelo examinador. Tal posição era representada quando, no plano sagital, podiam-se visualizar, nitidamente, o primeiro e segundo molares, enquanto que no plano coronal as raízes estavam completamente separadas. A medição da região de furca foi realizada na imagem existente no eixo sagital, ao passo que a quantificação de perda óssea por vestibular, lingual e interproximal foi feita nas imagens no eixo transaxial.

Para as análises volumétricas foi escolhido um eixo de interesse (coronal) e utilizado um programa específico de análise 3D (CTAn®).

O objetivo das análises volumétricas (3D) foi quantificar o volume do osso alveolar em duas regiões distintas: interproximal entre M1 e M2 e furca do M1 e, para tanto, foi escolhido como ponto de partida o corte (*slice*) onde as quatro raízes do primeiro molar inferior do animal foram visualizadas nitidamente. O ponto final da seleção foi determinado como a posição em que não era possível visualizar mais o osso interradicular, delimitando dessa forma a região a ser analisada. Com estes referenciais estabeleceu-se o intervalo de 100 a 120 cortes (*slices*) para análise da área de interesse. O retângulo foi a figura geométrica escolhida para representar a região a ser analisada; região de interesse (ROI). Esta forma geométrica foi adequada por interpolação à área a ser medida e obtivemos o volume de interesse (VOI).

Todos os cálculos são realizados sobre a região e/ou volume de interesses selecionados. Uma seleção consistente e precisa das regiões ou volumes de interesse é de fundamental importância para a obtenção de dados precisos e significativos. Alguns esclarecimentos sobre a terminologia para isso é útil (<http://www.skyscan.be> acessado em 10/02/2013). O termo "região de interesse", ou ROI, irá se referir a uma região selecionada de uma imagem única de seção transversal. A análise 2D é realizada dentro de um ROI. O "volume de interesse" refere-se à soma de todos os ROIs coletivos sobre um conjunto contíguo de fatias de imagem de seção transversal, representando um volume 3D selecionado. Dessa forma, as análises morfométricas em 3D são realizadas em um VOI.

Em seguida procedemos a binarização para diferenciar o osso do restante do tecido. Esse processo consiste na escolha de um valor limiar para os pixels

("threshold"), que será aplicado à imagem. Todos os pixels cujos valores forem maiores ou iguais aos do limiar serão convertidos em um valor denominado saturado. Em uma imagem digital com resolução de 8 bits, este valor saturado vale 255. De forma análoga, todos os pixels com valores inferiores aos do limiar serão convertidos em 0 (zero). O resultado é uma imagem em preto e branco, onde a fase branca corresponde ao tecido ósseo e a fase preta ao restante do tecido (não quantificado). Os parâmetros obtidos dependem muito dos valores de *threshold* utilizados nas imagens binarizadas (Lima et al., 2009).

Determinados o limite inferior em 40 e o limite superior em 160 (*grayscale threshold* 0-255), a mesma binarização foi usada para todas as amostras.

Recapitulando tem-se que cada fatia tomográfica é considerada como representativa de uma porção volumétrica da amostra, com a espessura do tamanho idêntico ao do lado do pixel da imagem. Empilhando-se essas fatias no espaço, obtêm-se um sólido tridimensional representativo da amostra de osso. A primeira etapa na construção do sólido tridimensional representativo da amostra de osso é a identificação de quais pixels de cada fatia tomográfica fazem parte da estrutura óssea e quais pixels representam vazios. Esse processo, chamado de segmentação ou binarização (Fig. 2), foi realizado tomando-se, primeiramente, uma pequena região de uma das fatias, contendo parte do osso e parte de vazio. Então, comparando-se os valores dos níveis de cinza com a imagem, optou-se por assumir o valor 160 como limiar. Ou seja, pixels com valor de cinza maior que 160 foram considerados espaços vazios e valores menores que 40 foram considerados osso.

Figura 2. Imagem da segmentação binária da área de interesse. **A.** Representa a imagem real. **B.** É a imagem binarizada de A.

3.2.1. Análise das medidas unidimensionais (2D)

As medidas lineares foram produzidas por meio do software DataViewer® (Skyscan®), onde é possível a visualização em três eixos ao mesmo tempo: sagital, coronal e transaxial. Para avaliar a perda óssea alveolar, as distâncias da junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar (CO) foram medidas em micrômetros (μm) em quatro locais distintos entre os primeiros (M1) e os segundos molares (M2) mandibulares. Uma linha imaginária foi traçada tangenciando a crista óssea tanto na furca do M1 quanto na região interproximal entre M1 e M2; perpendicularmente uma linha vertical cruzou a linha horizontal formando um ângulo de 90° , assim foi da JCE à crista óssea por vestibular (COV) = JCE-COV; da JCE à crista óssea por lingual (COL) = JCE-COL; do ponto de contato (PC) entre o primeiro e segundo molar e a crista óssea interproximal (COI); e da região de bifurcação (furca) do primeiro molar, medida correspondente à distância entre o teto da furca e a crista óssea interradicular (Fig. 3A e 3B). As imagens abaixo exemplificam como foi realizada a marcação para as distâncias avaliadas:

Figura 3. **A.** Eixo sagital ilustrando a medida linear da região de furca no primeiro molar e medida da região interproximal entre o M1 e M2. **B.** Eixo transaxial ilustrando as duas medidas lineares JCE-COV e JCE-COL. M1= primeiro molar mandibular; M2= segundo molar mandibular; M3= terceiro molar mandibular; JCE= junção cimento-esmalte; CO= crista óssea.

3.2.2. Análise das medidas volumétricas ou tridimensionais (3D)

Para a captura das imagens (Fig. 4) utilizadas na construção dos parâmetros volumétricos utilizou-se os softwares do fabricante do microtomógrafo (Data Viewer® e CTAnalyser®). Abaixo podemos observar as telas explicativas de cada etapa da seleção das imagens até chegar à geração das medidas e das imagens em 3D (ver figuras no Anexo).

Figura 4. Imagem da tela inicial do aplicativo Data Viewer®. Primeiro passo para iniciar a construção do volume da região de interesse, possibilita visualizar os três eixos de orientação da peça anatômica. **A:** Eixo coronal; **B:** Eixo transaxial; **C:** Eixo sagital.

Com os três eixos alinhados, o eixo coronal (A) foi o escolhido para se realizar a medição volumétrica. Esta escolha foi baseada na facilidade em se obter um guia para a reprodução em todas as amostras. Uma vez que a possibilidade de se desenhar um polígono no qual todos os lados tangenciassem as raízes do primeiro molar mandibular era mais reproduzível e confiável. A metodologia da escolha de uma figura geométrica para análise da região de interesse está documentada na literatura (Xu et al., 2013).

Escolhido o eixo sagital, foi necessário abrir o *software* (aplicativo) CTan® (Fig. 5) para o início da escolha das ferramentas que auxiliaram na construção dos parâmetros morfométricos de volume ósseo.

A escolha do “Top” e do “Bottom” (Fig. 5) foi o próximo passo para selecionar a quantidade de fatias (*slices*) que compõem a região de interesse (ROI). O “top”, primeiro *slice* selecionado é escolhido quando as quatro raízes do primeiro molar estão aparecendo nitidamente; o “bottom”, último *slice* selecionado é escolhido quando a imagem das raízes se funde, não mais possibilitando a visualização da parte óssea na região de interesse. O ROI representado nesse estudo foi composto de uma quantidade de cem a cento e vinte *slices* e depois disso uma figura geométrica na forma de um retângulo (Fig. 6) foi selecionada para propiciar a interpolação dos ROIs, ou seja, fazê-los unidos em uma só estrutura, para permitir o cálculo em 3D dos índices volumétricos. A escolha do eixo coronal, como dito anteriormente, foi decisiva para a escolha da região anatômica a ser analisada.

Após a interpolação dos ROIs, foi realizado o processamento da imagem (Fig. 7) e por fim, a geração dos dados volumétricos para a posterior confecção das imagens em 3D.

Figura 5: Imagem da tela inicial do aplicativo CTAnalyser®. Selecionando o “Top” e “Bottom” para a criação do ROI.

Figura 6. Imagem da escolha da forma geométrica. O retângulo vermelho é o guia para direcionar o local da região de interesse (ROI). Ele deve ficar posicionado de tal modo que os seus lados possam tocar a face de cada uma das raízes, em todos os “slices” que compõem o ROI.

Figura 7. Imagem ilustrativa da barra de ferramentas. Depois da interpolação do ROI é necessário fazer o processamento da imagem (A) em “processed images” indicado pelo círculo ‘vermelho’. Próxima etapa deve-se selecionar o ícone indicado pela seta azul (B) e a análise 3D será inicializada (C).

O cálculo do volume da região de interesse foi feito através do aplicativo CTan[®] que através do selecionamento prévio dos parâmetros de interesse (Fig. 8), nos fornece em uma tabela os dados requeridos e suas respectivas unidades de medida.

Com os dados de cada parâmetro calculados, foi possível construir a imagem tridimensional da área de interesse (Fig. 2 do Anexo) bem como da área total da amostra (Fig. 3 do Anexo) com a utilização do aplicativo CTVOX[®].

Figura 8. Selecionados os parâmetros de interesse, os resultados aparecem em uma tabela contendo cada parâmetro calculado pelo CTAnalyser® e sua respectiva unidade de medida.

3.3. Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0, (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Ademais, os dados foram registrados como média e seus respectivos desvios-padrão para os parâmetros lineares e volumétricos e a unidade experimental foi o rato. Para seleção do teste estatístico adequado foram realizados testes de homogeneidade e homocedasticidade. A análise estatística foi realizada através da aplicação de testes paramétricos. Para a comparação entre os resultados obtidos no grupo controle (C), no grupo teste (DP) e nos diferentes tempos de eutanásia (10 e 21 dias) foi aplicado o teste de análise de variância (*One Way ANOVA*) seguido do pós-teste de *Tukey*. Para todas as análises estatísticas, foi adotado nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A parte experimental envolvendo os animais transcorreu de maneira tranquila, sem grandes intercorrências. Cada grupo deste estudo teve um $n= 5$. Desse modo, se um animal morresse antes do período indicado para sua eutanásia, um novo animal de características semelhantes (idade, peso, raça) era introduzido no estudo, para que ao final da parte experimental cada um dos oito grupos permanecesse com cinco animais.

4.1. Medidas Lineares

Os resultados das medidas lineares foram extraídos de uma imagem bidimensional de uma fatia única escolhida por ser a mais representativa para detectar a perda óssea alveolar (Fig. 3A e 3B).

Os parâmetros avaliados para medir POA (perda óssea alveolar) foram:

- A) Furca - distância do teto da furca à crista óssea interradicular do M1.
- B) Vestibular - distância da JCE (junção cimento-esmalte) à crista óssea por vestibular = JCE-COV
- C) Lingual - distância da JCE à crista óssea por lingual = JCE-COL
- D) Interproximal - Ponto de contato entre M1 e M2 à crista óssea alveolar interproximal = PC-COI

Os valores de todas as mensurações, bem como os resultados que se mostraram estatisticamente significante ($p<0,05$) estão expressos nos gráficos e tabelas a seguir:

Figura 9. Nível ósseo alveolar para os grupos SHR e WK. As medidas indicam a distância média entre o teto da furca e a crista óssea interradicular (µm) de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intragrupo mostra maior perda óssea nos grupos DP quando comparados aos grupos C ($p < 0,05$). As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (µm) da medida linear da furca do M1 mandibular. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: *Spontaneously Hypertensive Rats*; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 10. Nível ósseo alveolar para os grupos SHR e WK. As medidas indicam a distância entre a JCE-COV (μm) de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intragrupo mostra maior perda óssea nos grupos DP quando comparados aos grupos C. A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia foi observada somente no grupo SHR-DP ($p < 0,05$). As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da medida JCE-COV do M1 mandibular. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: *Spontaneously Hypertensive Rats*; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 11. Nível ósseo alveolar para os grupos SHR e WK. As medidas indicam a distância entre a JCE-COL (µm) de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intragrupo mostra maior perda óssea no grupo DP quando comparado ao grupo C somente nos ratos SHR com eutanásia no 21º dia ($p < 0,05$). As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (µm) da medida JCE-COL do M1 mandibular. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: *Spontaneously Hypertensive Rats*; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 12. Nível ósseo alveolar para os grupos SHR e WK. As medidas indicam a distância entre o PC-COI (µm) de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intragrupo mostra maior perda óssea nos grupos DP quando comparados aos grupos C em ambos os ratos SHR e WK aos 21 dias ($p < 0,05$). As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (µm) da medida PC-COI do M1 mandibular. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: *Spontaneously Hypertensive Rats*; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão (μm) dos parâmetros lineares do grupo Wistar Kyoto (WK) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias.

Parâmetro	GRUPO WK (10 dias)		GRUPO WK (21 dias)	
	C	DP	C	DP
Furca (μm)	112,1 $\pm$ 31,77	468,78 $\pm$ 95,21*	185,58 $\pm$ 44,50	667,87 $\pm$ 220,16 [†]
JCE-COV (μm)	386,6 $\pm$ 56,34	1136,64 $\pm$ 255,13*	502,6 $\pm$ 92,70	1539,7 $\pm$ 218,89 [†]
JCE-COL (μm)	780,96 $\pm$ 178,01	862,14 $\pm$ 143,10	908,54 $\pm$ 120,71	961,7 $\pm$ 155,93
PC-COI (μm)	978,12 $\pm$ 228,56	1174,325 $\pm$ 153,33	954,94 $\pm$ 189,71	1511,16 $\pm$ 248,37 [†]

JCE: junção cimento esmalte; COV: crista óssea vestibular; COL: crista óssea lingual; PC: ponto de contato; COI: crista óssea interproximal; C: controle; DP: doença periodontal.

* Diferença estatisticamente significativa de C (10 dias) (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

† Diferença estatisticamente significativa de C (21 dias) (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

§ Diferença estatisticamente significativa de DP (10 dias) (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 2. Médias e desvios-padrão (μm) dos parâmetros lineares do grupo *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias.

Parâmetro	GRUPO SHR (10 dias)		GRUPO SHR (21 dias)	
	C	DP	C	DP
Furca (μm)	131,98 $\pm$ 54,44	611,6 $\pm$ 144,05*	143,02 $\pm$ 10,57	865,05 $\pm$ 69,48 [†]
JCE-COV (μm)	419,72 $\pm$ 227,39	923,6 $\pm$ 343,06*	448,48 $\pm$ 93,09	1552,9 $\pm$ 206,69 ^{†§}
JCE-COL (μm)	577,62 $\pm$ 79,87	763,88 $\pm$ 36,77	610,84 $\pm$ 100,99	921,43 $\pm$ 29,54 [†]
PC-COI (μm)	1070,8 $\pm$ 234,44	1453,4 $\pm$ 276,76	1051,6 $\pm$ 114,83	1681,66 $\pm$ 252,67 [†]

JCE: junção cimento esmalte; COV: crista óssea vestibular; COL: crista óssea lingual; PC: ponto de contato; COI: crista óssea interproximal; C: controle; DP: doença periodontal.

* Diferença estatisticamente significativa de C (10 dias) (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

† Diferença estatisticamente significativa de C (21 dias) (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

§ Diferença estatisticamente significativa de DP (10 dias) (ANOVA, Tukey, $p < 0,05$).

4.2. Medidas Volumétricas

Para a quantificação dos parâmetros volumétricos, que são a soma de um conjunto de cortes previamente selecionados e determinados de acordos com alguns pontos de referência, neste caso foram pontos anatômicos (raízes dos dentes), foi realizada a avaliação em dois locais distintos: a área da região de furca do M1 mandibular e a área da região interproximal entre M1 e M2 da mandíbula.

Para uma fácil compreensão dos resultados, os valores numéricos foram distribuídos em tabelas e para uma melhor visualização, foram confeccionados gráficos (um da região de furca e outro da região interproximal) para cada parâmetro tridimensional avaliado.

As tabelas contêm os grupos (WK e SHR) com os respectivos tempos de eutanásia (10 e 21 dias) e cada parâmetro e sua respectiva unidade de medida. Os valores para os quais houve diferença estatisticamente significativa estão devidamente assinalados nos gráficos a seguir.

Tabela 3: Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos de furca dos grupos Wistar Kyoto (WK) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias dos grupos controle (C) e doença periodontal (DP).

	Grupo WK (10 dias)		Grupo WK (21 dias)		Grupo SHR (10 dias)		Grupo SHR (21 dias)	
Parâmetro	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP
Volume Tecidual (VT, mm³)	1,04 ± 0,08	1,09 ± 0,14	1,23 ± 0,13	1,08 ± 0,17	1,07 ± 0,08	1,16 ± 0,13	0,95 ± 0,21	1,23 ± 0,16
Volume Ósseo (VO, mm³)	0,71 ± 0,08	0,53 ± 0,12	0,90 ± 0,13	0,58 ± 0,05 [†]	0,85 ± 0,06	0,73 ± 0,05	0,77 ± 0,13	0,61 ± 0,14
VO/VT (%)	68,05 ± 6,37	52,44 ± 2,76 [*]	73,26 ± 5,46	54,36 ± 5,51 [†]	79,60 ± 2,72	60,52 ± 3,55 [*]	81,75 ± 5,73	49,44 ± 6,04 [†]
Superfície Tecidual (mm²)	6,94 ± 0,21	7,08 ± 0,53	7,55 ± 0,54	7,00 ± 0,76	7,15 ± 0,29	7,44 ± 0,66	6,57 ± 1,01	7,82 ± 0,55
Superfície Óssea (SO, mm²)	15,73 ± 1,36	15,67 ± 2,18	17,54 ± 1,90	14,19 ± 0,19	12,54 ± 0,62	16,71 ± 3,17	11,34 ± 2,76	13,94 ± 2,79

* Diferença estatisticamente significativa de C (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

† Diferença estatisticamente significativa de C (21 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

§ Diferença estatisticamente significativa de DP (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

Tabela 3 (Continuação): Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos de furca dos grupos Wistar Kyoto (WK) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias dos grupos controle (C) e doença periodontal (DP).

	Grupo WK (10 dias)		Grupo WK (21 dias)		Grupo SHR (10 dias)		Grupo SHR (21 dias)	
Parâmetro	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP
Superfície de Interseção (mm²)	2,89 ± 0,49	1,68 ± 0,30*	3,18 ± 0,22	2,01 ± 0,27 [†]	3,41 ± 0,12	2,55 ± 0,49	3,53 ± 0,46	2,18 ± 0,26 [†]
SO/VO (mm⁻¹)	22,49 ± 2,83	30,02 ± 2,99*	19,53 ± 2,06	24,52 ± 1,89 [§]	14,72 ± 0,99	24,94 ± 0,70*	14,64 ± 1,58	22,96 ± 2,10 [†]
SO/VT (mm⁻¹)	15,17 ± 0,54	14,44 ± 1,31	14,23 ± 0,41	13,36 ± 1,93	11,7 ± 1 0,58	14,35 ± 1,31	11,90 ± 0,52	11,32 ± 1,47 [§]
Espessura de trabeculado (mm)	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,20 ± 0,03	0,15 ± 0,03*	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,01 [†]

* Diferença estatisticamente significativa de C (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

[†] Diferença estatisticamente significativa de C (21 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

[§] Diferença estatisticamente significativa de DP (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

Tabela 3 (Continuação): Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos de furca dos grupos Wistar Kyoto (WK) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias dos grupos controle (C) e doença periodontal (DP).

Parâmetro	Grupo WK (10 dias)		Grupo WK (21 dias)		Grupo SHR (10 dias)		Grupo SHR (21 dias)	
	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP
Número de trabéculas (mm ⁻¹)	4,70 ± 0,14	4,16 ± 0,47	4,91 ± 0,10	4,35 ± 0,51	4,04 ± 0,50	4,78 ± 0,15	4,33 ± 0,22	3,74 ± 0,48
Espaço entre trabéculas (mm)	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,30 ± 0,01 ^{†§}
Porosidade (%)	31,95 ± 6,37	51,35 ± 7,92*	26,74 ± 5,46	45,64 ± 5,51 [†]	20,41 ± 2,22	43,59 ± 7,54*	18,25 ± 5,73	50,56 ± 6,04 [†]

* Diferença estatisticamente significativa de C (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

† Diferença estatisticamente significativa de C (21 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

§ Diferença estatisticamente significativa de DP (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

Tabela 4: Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos da região interproximal dos grupos Wistar Kyoto (WK) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias dos grupos controle (C) e doença periodontal (DP).

	Grupo WK (10 dias)		Grupo WK (21 dias)		Grupo SHR (10 dias)		Grupo SHR (21 dias)	
Parâmetro	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP
Volume Tecidual (VT, mm³)	3,99 ± 0,33	3,73 ± 0,28	3,88 ± 0,62	4,74 ± 0,65	4,74 ± 0,61	5,29 ± 0,34	5,13 ± 0,55	5,17 ± 0,36
Volume Ósseo (VO, mm³)	1,66 ± 0,12	1,08 ± 0,18*	1,55 ± 0,23	1,79 ± 0,23§	2,48 ± 0,12	1,49 ± 0,14*	2,08 ± 0,30	1,46 ± 0,11†
VO/VT (%)	41,61 ± 2,06	29,07 ± 4,18*	40,19 ± 4,67	34,02 ± 3,68	42,76 ± 6,44	28,22 ± 2,78*	43,90 ± 3,74	28,17 ± 2,12†
Superfície Tecidual (mm²)	16,86 ± 1,00	16,16 ± 0,77	16,78 ± 1,60	18,88 ± 1,62	18,86 ± 1,31	20,21 ± 1,01	18,67 ± 1,48	20,06 ± 0,98
Superfície Óssea (SO, mm²)	31,85 ± 3,87	30,14 ± 7,24	28,11 ± 3,26	37,44 ± 5,89	33,42 ± 5,68	34,47 ± 2,62	32,77 ± 4,31	30,87 ± 3,03

* Diferença estatisticamente significativa de C (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

† Diferença estatisticamente significativa de C (21 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

§ Diferença estatisticamente significativa de DP (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

Tabela 4 (Continuação): Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos da região interproximal dos grupos Wistar Kyoto (WK) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias dos grupos controle (C) e doença periodontal (DP).

	Grupo WK (10 dias)		Grupo WK (21 dias)		Grupo SHR (10 dias)		Grupo SHR (21 dias)	
Parâmetro	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP
Superfície de Interseção (mm ²)	6,96 ± 0,75	4,97 ± 0,65*	6,63 ± 0,71	5,32 ± 0,70	7,11 ± 0,98	5,12 ± 1,24*	7,12 ± 0,98	5,17 ± 0,39
SO/VO (mm ⁻¹)	19,25 ± 2,01	23,19 ± 0,69	18,20 ± 1,13	20,98 ± 1,43	16,64 ± 2,10	23,25 ± 2,34*	15,81 ± 0,44	21,22 ± 1,33†
SO/VT (mm ⁻¹)	8,00 ± 0,82	7,36 ± 1,75	7,29 ± 0,63	7,14 ± 0,97	7,02 ± 0,33	6,53 ± 0,65	6,94 ± 0,64	5,97 ± 0,48
Espessura de trabeculado (mm)	0,23 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,25 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,19 ± 0,03*	0,25 ± 0,03	0,19 ± 0,00†

* Diferença estatisticamente significativa de C (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

† Diferença estatisticamente significativa de C (21 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

§ Diferença estatisticamente significativa de DP (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

Tabela 4 (Continuação): Médias e desvios-padrão dos parâmetros volumétricos da região interproximal dos grupos Wistar Kyoto (WK) e *Spontaneously Hypertensive Rats* (SHR) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias dos grupos controle (C) e doença periodontal (DP).

	Grupo WK (10 dias)		Grupo WK (21 dias)		Grupo SHR (10 dias)		Grupo SHR (21 dias)	
Parâmetro	C	DP	C	DP	C	DP	C	DP
Número de trabéculas (mm ⁻¹)	1,78 ± 0,13	1,45 ± 0,28	1,58 ± 0,17	1,68 ± 0,24	1,74 ± 0,13	1,46 ± 0,17	1,78 ± 0,22	1,51 ± 0,09
Espaço entre trabéculas (mm)	0,51 ± 0,06	0,56 ± 0,06	0,53 ± 0,07	0,58 ± 0,04	0,51 ± 0,06	0,63 ± 0,05	0,53 ± 0,05	0,70 ± 0,04 [†]
Porosidade (%)	58,39 ± 2,07	70,93 ± 4,18*	59,81 ± 4,67	65,98 ± 3,68	57,24 ± 6,45	71,78 ± 2,78*	56,10 ± 3,74	71,83 ± 2,12 [†]

* Diferença estatisticamente significativa de C (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

† Diferença estatisticamente significativa de C (21 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

§ Diferença estatisticamente significativa de DP (10 dias) (ANOVA, Tukey, p<0,05).

Figura 13. Volume tecidual (mm³) para os grupos SHR e WK. As medidas indicam o volume total de interesse na região de furca **(A)** e interproximal, entre M1 e M2 **(B)**, de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas análises intra e intergrupos ($p > 0,05$). As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm³) do volume tecidual. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 14. Volume ósseo (mm³) na região de furca (A) e interproximal, entre M1 e M2 (B). As medidas indicam o volume ósseo, volume total binarizado dentro do VOI, de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise entre os grupos C e DP mostrou diferenças estatisticamente significantes para WK aos 21 dias na região de furca e para todos os grupos, exceto para WK aos 21 dias na região interproximal. A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia foi observada somente para (B) no grupo WK-DP. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm³) do volume ósseo na região A e B. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). VOI: volume de interesse; SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 15. Superfície do tecido (mm²) para os grupos SHR e WK. As medidas indicam a área de superfície do volume de interesse de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intragrupo e a progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia não demonstraram diferenças com relevância significativa. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm²) da superfície do tecido nas regiões de furca (A) e interproximal (B). *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 16. Superfície óssea (mm²) para os grupos SHR e WK. As medidas indicam a área de todos os objetos sólidos dentro do VOI de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. A análise intragrupo não mostrou diferença estatística para as regiões furca **(A)** e interproximal **(B)**. A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia para este parâmetro também não foi observada. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm²) da superfície óssea na região A e B. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). VOI: volume de interesse; SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 17. Superfície de interseção (mm²) para os grupos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. As medidas indicam a superfície do VOI entrecortado por objetos binarizados sólidos, isto é, a parte da superfície do VOI na qual as partículas ósseas se cruzam, na interface do trabeculado ósseo. A análise intergrupo (C e DP) mostrou diferenças significantes no grupo SHR e WK aos 10 dias na região de furca **(A)** além do grupo WK aos 10 dias e nos grupos SHR e WK aos 21 dias na região interproximal **(B)**. A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia não foi observada. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm²) da superfície de interseção na região A e B. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura; VOI: volume de interesse.

Figura 18. Relação entre a superfície óssea (SO) e o volume total (VT) (1/mm) para os grupos SHR e WK. As medidas indicam a proporção entre a área de superfície e o volume total medido dentro do VOI, na região de furca (A) e na região interproximal (B), nos tempos de 10 e 21 dias para ratos SHR e WK. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise estatística mostrou diferença significativa apenas para o grupo SHR-DP entre o 10º e o 21º dia demonstrando a progressão da DP 11 dias após a remoção da ligadura. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm^{-1}) da proporção SO/VT nas duas regiões avaliadas furca e interproximal. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura; VOI: volume de interesse.

Figura 19. Relação entre a superfície óssea (SO) e o volume ósseo (VO) (1/mm) para os grupos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. As medidas indicam a razão entre a superfície do osso com o volume medido em 3D no VOI, nas regiões de furca (A) e interproximal (B). Denominada também de superfície específica é um parâmetro útil para caracterizar a espessura e complexidade das estruturas ósseas. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intragrupo (entre 10 e 21 dias) mostrou diferença estatisticamente significativa somente para WK-DP em A. A análise intergrupos (C e DP) mostrou diferença estatisticamente significativa em A com SHR aos 10 e 21 dias; WK aos 10 dias e em B com SHR aos 10 e 21 dias. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm^{-1}) da proporção SO/VO nas duas regiões avaliadas furca e interproximal. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). VOI: volume de interesse; SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 20. Relação entre o volume ósseo (VO) e o volume total (VT) medidos em porcentagem para os grupos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. As medidas indicam a proporção do VOI ocupado por osso. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intergrupos mostrou diferença estatisticamente significativa em todos os grupos em A (região de furca) e nos grupos SHR aos 10 e 21 dias e WK aos 10 dias em B (região interproximal). A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia não foi observada. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (%) da proporção VO/VT na região de furca e na região interproximal. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). VOI: volume de interesse; SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 21. Número de trabéculas (Tb.N) (1/mm) para os grupos SHR e WK. A estrutura de densidade linear ou número trabecular implica o número de transversais através de uma estrutura trabecular feito por unidade de comprimento em um caminho linear aleatório através do VOI de ratos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intragrupo e intergrupos não mostrou diferença estatisticamente significativa para nenhuma região avaliada em A (furca) nem em B (interproximal). As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm^{-1}) do Tb. N nas regiões analisadas. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura; VOI: volume de interesse; Tb.N: número de trabéculas

Figura 22. Espessura de trabéculas (Tb.Th) (mm) para os grupos SHR e WK ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura, medidos na região da furca (A) e na região interproximal entre M1 e M2 (B). As medidas indicam a espessura trabecular óssea no qual a principal vantagem da medição da espessura local é que o viés da orientação 3D da estrutura é mínimo. A distribuição de espessura é um poderoso método para caracterizar a forma de uma estrutura complexa, no caso o osso trabecular. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intergrupos (C e DP) mostrou diferença estatisticamente significativa apenas para os grupos SHR aos 10 e aos 21 dias tanto para região A quanto para região B. A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia não foi observada para nenhum grupo em nenhuma das regiões avaliadas. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm) para Tb.Th nas regiões avaliadas. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura; Tb.Th: espessura do trabeculado.

Figura 23. Espaço entre trabéculas (Tb.Sp) (mm) para os grupos SHR e WK na região de furca (A) e na região interproximal (B). As medidas indicam a separação trabecular que é essencialmente a espessura dos espaços definidos pela binarização dentro do VOI. As medidas foram realizadas ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intergrupos (C e DP) mostrou diferença estatisticamente significativa para SHR aos 21 dias tanto para região A quanto para região B. A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia foi observada somente no grupo SHR-DP na região de furca. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (mm) do Tb.Sp nas regiões avaliadas. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura; Tb.Sp: separação trabecular.

Figura 24. Porosidade total (%) para os grupos SHR e WK na região de furca (A) e na região interproximal (B). A porosidade total é o volume de todos os poros (abertos e fechados) como uma porcentagem do volume total do VOI. As medidas foram realizadas ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intergrupos (C e DP) mostrou diferença estatisticamente significativa para todos os grupos tanto para região A quanto para região B; exceto WK aos 21 dias na região interproximal. A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia não foi observada somente no grupo SHR-DP na região de furca. As barras representam médias $\pm$ desvios-padrão (%) da porosidade nas regiões avaliadas. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura; VOI: volume de interesse.

Figura 25. Densidade Mineral Óssea (DMO) para os grupos SHR e WK na área total (furca e interproximal). A densidade mineral óssea é quantidade de minerais encontrada nos ossos e pode ser medida em qualquer osso do corpo. As medidas foram realizadas ao 10º e ao 21º dia após a colocação da ligadura. Os valores de 21 dias correspondem aos efeitos de 10 dias de doença periodontal induzida por ligadura e 11 dias após a remoção desta. A análise intergrupos (C e DP) mostrou diferença estatisticamente significativa para todos os grupos. A progressão da DP após a remoção da ligadura entre o 10º e o 21º dia não foi observada. **A.** No gráfico as barras representam médias ± desvios-padrão (em %) da DMO nas regiões avaliadas. **B.** A tabela mostra os valores numéricos expressos como médias ± desvios-padrão em porcentagem. *Nível de significância foi considerado 95% (Anova, Tukey, $p < 0,05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto; C: controle; DP: doença periodontal induzida por ligadura; VOI: volume de interesse; DMO: densidade mineral óssea. Médias e desvios-padrão da DMO da região total do VOI dos grupos Wistar Kyoto (WK) e Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) com tempo de eutanásia aos 10 e aos 21 dias dos grupos controle (C) e doença periodontal (DP).

De todos os parâmetros analisados os mais representativos para detectar a perda óssea alveolar neste modelo de estudo foram:

Na avaliação em 2D (medidas lineares ou bidimensionais):

- Furca e JCE-COV.

Na avaliação dos parâmetros 3D (medidas volumétricas ou tridimensionais):

- Relação entre a superfície óssea (SO) e o volume ósseo (VO) (expressa como 1/mm); relação entre o volume ósseo (VO) e o volume total (VT) expressa em percentagem; a porosidade (PO) e a densidade mineral óssea ambas expressas em percentagem.

A diferença percentual entre os métodos de avaliação propostos neste estudo foi calculada e o resultado é mostrado no gráfico abaixo.

Figura 26. Diferença percentual em relação ao método de medida (bidimensional ou tridimensional) utilizado para avaliação perda óssea alveolar decorrente da doença periodontal induzida.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Este estudo apresentou uma técnica 3D que permite ilustrar o estado do osso alveolar em um modelo em ratos sem ligadura (controle) e com periodontite experimental induzida por ligadura (DP) além de fornecer dados sobre as alterações ósseas alveolares lineares e volumétricas, que ocorreram durante o experimento. Foi demonstrado que a perda de osso alveolar ocorreu em ambos os grupos com doença periodontal. Isto sugere que a infecção periodontal deve contribuir para o desenvolvimento de perda de massa óssea, independentemente da presença do estado de hipertensão (ratos SHR) ou não (ratos WK).

Muitos estudos já demonstraram a relação da infecção patogênica com a perda óssea alveolar como Polak e colaboradores (2009), que descobriram que uma infecção polimicrobiana com *P. gingivalis* / *F. nucleatum* agravou a perda óssea alveolar e induziu uma resposta inflamatória mais forte em comparação com o observado após infecção monobacteriana. Isto sugere que a destruição do tecido se mantém após a infecção periodonto-patógena ser erradicada e que o processo de destruição é mediado pela resposta do hospedeiro.

A ligadura pode causar perda significativa no trabeculado ósseo alveolar, resultando em uma maior perda óssea e deterioração da microestrutura óssea alveolar. Sobre os achados clínicos do presente estudo na análise intra-grupo, os grupos DP mostraram perda óssea superior, após 10 dias da colocação da ligadura em relação ao grupo controle, indicando que o método de ligadura foi eficiente para induzir periodontite. Este resultado está de acordo com Bastos et al. (21) que verificaram que há maior perda óssea na área de bifurcação, bem como a espécie SHR apresentou graves alterações no osso alveolar, independentemente da

inflamação. Aos 21 dias, os grupos DP mostraram um aumento da perda de massa óssea acumulada em comparação com o grupo controle, indicando que eles não apresentaram formação óssea na fase não-ligadura deste estudo. No entanto, verificou-se uma perda óssea mais elevada entre 10 e 21 dias apenas no grupo SHR-DP. De qualquer modo pode-se observar com este estudo que a microtomografia computadorizada é um método capaz de detectar a perda óssea e que esta pode ser interpretada de diversas maneiras dependendo do local ou sítio escolhido e também do modo como a análise é feita através dos diversos recursos que os aplicativos do método escolhido (SKYSCAN®-BRUKER) oferecem.

Esse trabalho fez a avaliação da perda óssea alveolar pela doença periodontal, utilizando um modelo de estudo em ratos por meio da análise microtomográfica. É de conhecimento geral que o método mais frequente de mensuração da perda óssea em estudos em animais é a análise histológica. No entanto, estas têm limitada capacidade de identificar os níveis ósseos associados com os tecidos saudáveis e os associados à doença periodontal. Para minimizar esta limitação o estudo de Fernandes et al. (2007) comparou os procedimentos de medida da altura óssea histológica e morfométrica e nos resultados os autores definiram que para a realização de medidas lineares, ambas as análises histométrica (histológica) e morfométrica são capazes de detectar diferenças induzida por ligadura em altura óssea em ratos. Os autores supracitados estão de acordo com este estudo quando mostram que a análise histomorfométrica através da análise de micro-CT é capaz de detectar perda óssea alveolar; não necessitando de estudo histológico para confirmação dos dados. Aliás, uma das grandes vantagens do sistema de micro-CT é justamente que este é um sistema de avaliação não destrutivo.

Pode-se dizer que a histologia é um método complementar à análise 3D. Sua importância se dá no momento que traz informações qualitativas do processo biológico envolvido com inflamação e alterações teciduais. (Lindhe et al., 2003; Molinaro et al., 2010).

A cicatrização óssea alveolar foi examinada quantitativamente por imagens tomográficas através da micro-CT. No presente trabalho a maior dificuldade encontrada foi a de se estabelecer uma forma precisa para quantificar o osso perdido na região de furca e na interproximal, uma vez que o que foi medido era o espaço onde não havia mais osso, ou seja, o osso calculado era o remanescente da perda óssea alveolar. O que foi perdido não foi possível, nesse modelo de estudo, de ser mensurado, contudo conseguiu-se calcular quantitativa e qualitativamente o osso remanescente após a presença da doença periodontal induzida por ligadura.

Desde o seu desenvolvimento inicial a microtomografia (micro-CT) tornou-se uma ferramenta importante para a análise da morfologia óssea, principalmente para o osso esponjoso/trabecular. Parâmetros estereológicos têm sido usados como uma estimativa para a arquitetura do osso trabecular. (Estereologia = estudo das partes sólidas dos corpos vivos). A microestrutura da rede trabecular é frequentemente medida usando medidas tais como fração de volume de osso (BV/TV), número trabecular (Tb.N), espessura trabecular (Tb.Th), separação trabecular (Tb.Sp), e para a proporção entre a superfície óssea e o volume ósseo (BS/BV).

Como dito anteriormente, o sistema de micro-CT foi introduzido pela primeira vez por Feldkamp et al. (1989). Este sistema foi validado como um método de análise 3D por Muller et al. (1998) ao demonstrar a boa correlação entre os resultados da análise em 3D com a consolidada histologia 2D. Este método de análise permite medições em 3D de quantidade óssea e uma avaliação da

arquitetura e da microestrutura do osso, que são importantes para a estimativa da durabilidade e força óssea, por exemplo. Ambos os métodos de análise são úteis na verificação dos parâmetros morfométricos, porém uma desvantagem a respeito da análise histológica, segundo Chackartchi et al. (2011) é que ela é baseada num cálculo quantitativo de uma imagem 2D, feita a partir da porção central da amostra, e assim isto está em contraste com a análise de micro-CT, o qual é feita a partir do volume total da amostra, e, portanto, mais completa neste aspecto.

Finalmente, em todos os casos a escolha de parâmetros de verificação deve basear-se em particular na avaliação dos resultados relevantes para a questão de pesquisa de interesse. Alguns autores (Kim et al., 2004; Verdelis et al., 2011) indicam que as medições morfométricas não devem ser diretamente comparadas entre os sistemas de micro-CT. Além disso, certas condições, incluindo a dimensão do voxel, para estudos de morfometria óssea trabecular em ratos devem ser escolhidas com base no sistema de micro-CT específico e as medições de interesse principal (dependente do fabricante). Daí a dificuldade no momento da comparação dos estudos que utilizam o método da microtomografia computadorizada para medição óssea.

Polak et al. (2009) demonstraram que o modelo experimental de estudo para doença periodontal em ratos é um modelo bem aceito, o qual mimetiza as características reais da doença periodontal. O objetivo dos autores foi alcançado no que diz respeito ao estabelecer um modelo animal de infecção poli-microbiana para o estudo da patogênese da doença periodontal. Além disso, a literatura tem mostrado previamente que a tecnologia de micro-CT é mais sensível do que o método de análise bidimensional (Wilensky et al., 2005). Essa técnica para avaliação volumétrica de perda óssea alveolar em ratos é relativamente simples e precisa e,

devido à sua alta sensibilidade, permite ao investigador reduzir o número de animais necessários em cada grupo experimental.

Diversos autores (Engelke et al., 1996; Genant et al., 1996; Croucher et al., 1996; Schneider et al., 2007) acreditam que a análise morfométrica ultraestrutural dos fenótipos e o estudo das relações entre os fenótipos de osso em diferentes níveis de hierarquia abrirão novas perspectivas na avaliação da qualidade óssea em todos os níveis da hierarquia de osso, em particular, há a hipótese de que a previsão da mecânica do osso possa ser melhorada em certas doenças. Comparando os resultados obtidos pela histomorfometria tradicional e a micro-CT, ao analisar o enxerto de seio maxilar em humanos, com Biogran® e osso autógeno, Trisi e colaboradores (2006) observaram que os valores da quantidade de osso mineralizado obtidos por ambas as técnicas foram similares para todas as amostras, sem diferenças estatisticamente significantes. Assim também os valores dos parâmetros Tb.Th e Tb.Sp obtidos pela micro-CT foram mais baixos do que aqueles obtidos com a histomorfometria, mas sem diferença estatística significativa entre eles.

A micro-CT foi validada como método de avaliação de medida e análise em 3D do osso esponjoso por Mueller et al. (1998) que compararam os resultados morfométricos da histomorfometria convencional aos resultados da micro-CT. Os autores demonstraram que a força da representação 3D da arquitetura do osso trabecular em comparação com a histologia convencional 2D, mostrou excelente correlação dos índices medidos.

Ebina et al., (2009) observaram que a análise de micro-CT 3D mostrou pouca variação na VOI óssea entre mandíbulas de controle na semana zero, o que indica que o volume ósseo em mandíbulas de controle foi uniforme, com pequena variação

individual. A variação do volume de osso entre as mandíbulas dos grupos controle e teste (defeito ósseo periodontal) era pequena na semana zero. Isto mostrou que o volume de ambos os defeitos era constante, confirmando que o modelo experimental era consistente e uniforme. Esta observação está de acordo com os resultados do presente trabalho, que também não revelou diferença estatística significativa entre os grupos controles dos ratos WK e SHR nos dois tempos de avaliação do estudo.

A micro-CT 3D é uma ferramenta poderosa para análise quantitativa da morfologia de osso alveolar. Algumas investigações (Jin et al., 2007) usando o modelo experimental de periodontite induzida por ligadura e a micro-CT 3D puderam proporcionar um melhor entendimento da ultraestrutura complexa do trabeculado ósseo alveolar e a aplicação clínica de agentes regenerativos, por exemplo, para tratar a perda de osso alveolar.

Parâmetros estereológicos (Dempster et al., 2013) têm sido usados como uma aproximação para a arquitetura do osso trabecular. Índices estruturais, como fração de volume ósseo (BV / TV), número trabecular ($Tb.N$), espessura trabecular ($Tb.Th$) e separação trabecular ($Tb.Sp$), têm sido amplamente estudados para investigar condições patológicas no osso. Devido à sua alta resolução e não destrutividade, a microtomografia vem sendo utilizada para captar imagens precisas em três dimensões (3D) da microestrutura trabecular (Kim et al., 2004).

Verdelis et al. (2011) fizeram uma observação importante: as medidas da morfometria trabecular não devem ser diretamente comparadas entre os diferentes sistemas de micro-CT e ainda, o tamanho do voxel para estudo de osso em modelo animal (ratos) deve ser escolhido baseado no sistema que for utilizado e as medidas de principal interesse. Outros autores (Fernandes et al., 2007; Liberman et al., 2010)

mostraram correlação na análise comparativa da altura óssea histométrica e morfométrica na periodontite induzida por ligadura em ratos.

No presente estudo a diferença entre os grupos teste e controle não demonstrou grande variação, pois neste caso não houve por exemplo, a colocação de nenhum biomaterial no defeito ósseo originado pela doença periodontal induzida por ligaduras. Quando há a presença de qualquer tipo de enxerto ósseo, particulado ou não, a diferença entre os grupos é mais notável. Alguns autores conseguiram observar variedade nas diferenças entre grupos quando enxertos de diversos tipos foram utilizados em seus estudos. Por exemplo, Lambert et al. (2011) puderam atestar o aumento ósseo subantral em coelhos, através de análise histológica e de micro-CT, que a hidroxiapatita bovina pareceu ser o mantenedor de espaço mais adequado, em comparação com o enxerto de osso autógeno para estabilidade de volume em longo prazo (Lambert et al., 2011). De modo semelhante Chackartchi et al. (2011) também conseguiram perceber diferenças relevantes nos grupos com preenchimento de biomaterial em um estudo de elevação de seio maxilar em pacientes, quando comparados por meio de análise microtomográfica. A reconstrução 3D da sequência de imagens tomográficas da micro-CT permitiu aos autores encontrar quase o mesmo corte histológico analisado e também correlacionar a seção 2D com as estruturas em 3D.

A análise microtomográfica permite além do cálculo de volume ósseo da amostra e outros parâmetros morfométricos importantes, visualizar e contextualizar a imagem tridimensional do trabeculado ósseo e isto é um achado enriquecedor para os trabalhos que anseiam por estudar e compreender a complexa rede óssea trabecular. Muitos estudos (De Smet et al., 2006; Park et al., 2007; Li & Amar, 2007; Jin et al., 2007; Cantley et al., 2009; Versiani et al., 2011) vêm utilizando a técnica de

micro-CT para ilustrar com imagens ricas em detalhes, a estrutura óssea trabecular e até mesmo a cortical. No estudo de Trisi e colaboradores (2006), as reconstruções em 3D se mostraram como uma representação precisa do trabeculado ósseo e permitiram a exploração visual da arquitetura óssea em todas as partes da biópsia, colhida na cirurgia de reentrada para colocação de implantes.

No estudo de McGuire et al. (2009) os seguintes parâmetros foram examinados usando análise de micro-CT: anatomia bidimensional e 3D do osso preexistente e do osso recém-formado adjacente às superfícies das raízes, a configuração 3D do espaço do ligamento periodontal e a comprovação através da micro-CT de achados histológicos da regeneração periodontal, identificando novo osso. Assim, os cortes histológicos, utilizados no estudo, confirmaram e ampliaram os resultados obtidos com a micro-CT.

As análises de micro-CT revelaram uma redução significativa na espessura do osso cortical e trabecular. Em ratos com doença renal crônica na caracterização de osso mandibular em um modelo de rato de doença renal crônica (Lee et al., 2010).

Os recentes avanços nas técnicas de imagem têm permitido a avaliação e análise de estruturas ósseas finas, como o osso trabecular, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudos anteriores (Thomsen et al., 2005) descobriram que os dados da micro-CT tridimensional pode substituir com precisão a análise histológica convencional na avaliação quantitativa do osso. Cowan et al. (2007) demonstraram que a micro-CT quantificação da imagem da área de osso novo se correlaciona bem com os resultados da análise histológica. Aumento significativo da densidade óssea era visível na parte superior e margens do defeito mais baixas, e a cobertura do defeito foi quase completa em cortes coronais. A margem de defeito e o osso recém-

formado não poderiam ser diferenciados por causa do aumento da radio densidade do regenerado ósseo. No entanto, a visualização de fechamento em todo o defeito na micro-CT não necessariamente se correlaciona com o grau de mineralização, portanto a análise histológica e histomorfométrica devem ser combinadas com a análise da micro-CT para obter uma compreensão mais completa da situação (Jang et al., 2012; Kaigler et al., 2013).

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo e na revisão de literatura é possível dizer que a microtomografia computadorizada é um importante método de avaliação e detecção para perda óssea alveolar. A metodologia empregada mostrou ser bastante interessante para a caracterização do osso trabecular nos grupos controle e doença periodontal. O microtomógrafo de raio-x de bancada de alta resolução modelo 1172 da SkyScan é um equipamento de fácil utilização e o seu software CT-Analyser calcula diversos parâmetros da microestrutura sendo uma importante ferramenta para investigações microestruturais do osso trabecular.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível delinear o passo-a-passo da metodologia referente à micro-CT, para avaliação da perda óssea alveolar por meio da indução da doença periodontal em um modelo animal.

O método tomográfico foi sensível o suficiente para identificar que os grupos DP apresentam maior perda óssea detectada pelo método da microtomografia computadorizada quando comparados aos grupos C, neste modelo de estudo, tanto para ratos SHR quanto para ratos WK.

A região escolhida e o método de análise (bi ou tridimensional) têm influência no resultado. Assim medidas lineares e medidas volumétricas de uma mesma amostra podem apresentar porcentagens diferentes em relação à perda óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali J, Pramod K, Tahir MA, Ansari SH. Autoimmune responses in periodontal diseases. *Autoimmunity Reviews* 2011; 10:426–431.

Argenta, MA; Buriol, TM; Hecke MB. Metodologia para obtenção de parâmetros físicos e geométricos do osso trabecular função de imagens de micro tomografia. www.grupo.bioengenharia.ufpr.br acessado em 20/08/2013.

Bak EJ, Park HG, Kim M, Kim SW, Kim S, Choi SH, Cha JH, Yoo Y-J. The Effect of Metformin on Alveolar Bone in Ligature-Induced Periodontitis in Rats: A Pilot Study. *Journal of Periodontology* 2010; 81:412-419.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes and Infection* 2000; 2:1181-1192.

Bastos MF, Brilhante FV, Gonçalves TED, Pires AG, Napimoga MH, Marques MR, Duarte PM. Hypertension May Affect Tooth-Supporting Alveolar Bone Quality: A Study in Rats. *Journal of Periodontology* 2010; 81:1075-1083.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010; 25;7:1468-1486.

Britz HM, Jokihaara J, Leppanen OV, Jarvinen T, Cooper DML. 3D visualization and quantification of rat cortical bone porosity using a desktop micro-CT system: a case study in the tibia. *Journal of Microscopy* 2010:1-6.

Cantley MD, Bartold PM, Marino V, Reid RC, Fairlie DP, Wyszynski RN, Zilm PS, Haynes DR. The use of live-animal micro-computed tomography to determine the effect of a novel phospholipase A2 inhibitor on alveolar bone loss in an in vivo mouse model of periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 2009; 44:317-322.

Chackartchi T, Iezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piatelli A, Shapira L. Sinus floor augmentation using large (1–2mm) or small (0.25–1mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clinical Oral Implant Research* 2011; 22: 473-480.

Cohen A, Dempster DW, Müller R, Guo XE et al. Assessment of trabecular and cortical architecture and mechanical competence of bone by high-resolution peripheral computed tomography: comparison with transiliac bone biopsy. *Osteoporosis International* 2010; 21:263–273.

Coimbra LS, Rossa Jr C, Guimarães MR, Gerlach RF, muscara MN, Spolidorio DMP, Herrera BS, Spolidorio LC. Influence of antiplatelet drugs in the pathogenesis of experimental periodontitis and periodontal repair in rats. *Journal of Periodontology* 2011; 82:767-777.

Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, Walder B, Zhang X, Soo C, et al. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Engineering* 2007; 13:501-512.

Croucher PI, Garrahan NJ, Compston JE. Assessment of cancellous bone structure: comparison of strut analysis, trabecular bone pattern factor, and marrow space star volume. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996; 11:955-961.

De Smet E, Jaecques SVN, Wevers M, Jansen JA, Jacobs R, Vander Sloten J, Naert IE. Effect of controlled early implant loading on bone healing and bone mass in guinea pigs, as assessed by micro-CT and histology. *European Journal of Oral Sciences* 2006; 114: 232-242.

Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *Journal of Bone and Mineral Research* 2013; 28; 1:1-16.

Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, Sasano Y. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. *Oral Diseases* 2009; 15:273-280.

Engelke K, Song SM, Gluer CC, Genant HK. A digital model of trabecular bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996; 11; 4:480-489.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of Bone Mineral Research* 1989; 4:3-11.

Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Brazilian Oral Research* 2007; 21(3):216-221.

Ferrare N, Leite AF, Caracas HCPM, Azevedo RB, Melo NS, Figueiredo PTS. Cone-beam computed tomography and microtomography for alveolar bone measurements. *Surgical and Radiologic Anatomy* 2013; 35:495-502.

Genant HK, Engelke K, Fuerst T, Gluer CC, et al. Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996; 11; 6:707-730.

Jang J-W, Yun J-H, Lee K-I, Jang J-W et al. Osteoinductive activity of biphasic calcium phosphate with different rhBMP-2 doses in rats. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology* 2012; 113:480-487.

Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba Jr M, Kostenuik PJ, Giannobile WV. RANKL Inhibition Through Osteoprotegerin Blocks Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2007; 78:1300-1308.

Kaigler D, Silva EA, Mooney DJ. Guided Bone Regeneration Using Injectable Vascular Endothelial Growth Factor Delivery Gel. *Journal of Periodontology* 2013; 84:230-238.

Kim D-G, Christopherson GT, Dong XN, Fyhrie DP, Yeni YN. The effect of microcomputed tomography scanning and reconstruction voxel size on the accuracy of stereological measurements in human cancellous bone. *Bone* 2004; 35:1375-1382.

Lambert F, Léonard A, Drion P, Sourice S, Layrolle P, Rompen E. Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. *Clinical Oral Implant Research* 2011; 22:538-545.

Lee MM, Chu EY, El-Abbadi MM, Foster BL, Tompkins KA, Giachelli CM, Somerman MJ. Characterization of Mandibular Bone in a Mouse Model of Chronic Kidney Disease. *Journal of Periodontology* 2010; 81:300-309.

Li CH, Amar S. Morphometric, Histomorphometric, and Microcomputed Tomographic Analysis of Periodontal Inflammatory Lesions in a Murine Model. *Journal of Periodontology* 2007; 78:1120-1128.

Liberman DN, Pilau RM, Orlandini LF, Gaio EJ, Rösing CK. Comparison of two methods for alveolar bone loss measurement in an experimental periodontal disease model in rats. *Brazilian Oral Research* 2010; 80; 25(1):80-84.

Lima I, Lopes RT, Oliveira LF, Alves JM. Análise de estrutura óssea através de microtomografia computadorizada 3D. *Revista Brasileira de Física Médica* 2009; 2; 1:6-10.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical periodontology and implant dentistry. Fourth Edition 2003 by Blackwell Munksgaard, a *Blackwell Publishing Company*.

Löe H, Anerud A, Boysen H. The natural history of periodontal disease in man: prevalence, severity, and extent of gingival recession. *Journal of Periodontology* 1992; 63, 6:489-495.

McGuire MK, Scheyer ET, Schupbach P. Growth Factor–Mediated Treatment of Recession Defects: A Randomized Controlled Trial and Histologic and Microcomputed Tomography Examination. *Journal of Periodontology* 2009; 80:550-564.

Molinaro, Etelcia Moraes. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010; capítulo 3: 89-188.

Molon RS, de Avila ED, Nogueira AV, de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, Cirelli JA. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. *Journal of Periodontology* 2013; Posted online on June 27, 2013.

Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998; 23:59–66.

Park CH, Abranson ZR, Taba Jr M, Jin Q, Chang J, Kreider JM, Goldstein SA, Giannobile WV. Three-Dimensional Micro-Computed Tomographic Imaging of Alveolar Bone in Experimental Bone Loss or Repair. *Journal of Periodontology* 2007; 78:273-281.

Peyrin F. Evaluation of bone scaffolds by micro-CT. *Osteoporosis International* 2011; 22:2043-2048.

Polak D, Wilensky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, WeissEI, Hour-Haddad Y. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/ *Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response. *Journal of Clinical Periodontology* 2009; 36:406-410.

Schneider P, Stauber M, Voide R, Stampanoni M, Donahue LR, Müller R. Ultrastructural properties in cortical bone vary greatly in two inbred strains of mice as assessed by synchrotron light based micro- and nano-ct. *Journal of Bone Mineral Research* 2007; 22:1557-1570.

Seto H., Ohba H, Tokunaga K, Hama H, Horibe M, Nagata T. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research* 2008; 43; 3:261-267.

Silva AMH. Análise morfométrica 2D e 3D de amostras de osso trabecular utilizando microtomografia tridimensional por raio-x. Dissertação do programa de pós-graduação interunidades bioengenharia EESC - FMRP - IQSC da Universidade de São Paulo, 2009. Acessado em <http://www.teses.usp.br> em 20/08/2013.

Slyfield CR, Tkachenko EV, Wilson DL, Hernandez CJ. Three-dimensional dynamic bone histomorphometry. *Journal of Bone and Mineral Research* 2012; 27; 2:486-495.

Sodek J, McKee MC. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000, 2000; 24:99-126.

Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W, et al. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *Journal of Microscopy* 2005; 218:171-179.

Trisi P, Rebaudi A, Calvari F, Lazzara RJ. Sinus graft with biogran, autogenous bone, and PRP: a report of three cases with histology and micro-ct. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 2006; 26:113-125.

Uchiyama T, Tanizawa T, Muramatsu H, Endo N, Takahashi HE, Hara T. Three-dimensional microstructural analysis of human trabecular bone in relation to its mechanical properties. *Bone* 1999; 25, 4:487-491.

Vanderlei JMTMM, Messoria MR, Fernandes PG, Novaes JR AB, Palioto DB, Grisi MFM, Souza SLS, Gerlach RF, Antoniali C, Taba Jr M. Arterial hypertension perpetuates alveolar bone loss. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2012; Early Online: 1-5. Acessado em informahealthcare.com em 14/08/12.

Verdelis K, Lukashova L, Atti E, Mayer-Kuckuk P, Peterson MGE, et al. MicroCT morphometry analysis of mouse cancellous bone: Intra- and inter-system reproducibility. *Bone* 2011; 49:580-587.

Versiani MA, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Pulp pathosis in inlayed teeth of the ancient Mayas: a microcomputed tomography study. *International Endodontic Journal* 2011; 1-5.

Waarsing JH, Day JS, Weinans H. An improved segmentation method for in vivo micro-ct imaging. *Journal of Bone and Mineral Research* 2004; 19:1640-1650.

Wilkie JR, Giger ML, Chinander MR, Vokes TJ, Li H, Dixon L, Jaros V. Comparison of radiographic texture analysis from computed radiography and bone densitometry systems. *Medical Physics* 2004; 31(4):882-891.

Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Houri-Haddad Y, Shapira L. Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in porphyromonas gingivalis-infected mice using micro- computed tomography. *Journal of Periodontology* 2005; 76:1282-1286.

Wu G, Chen L, Zhu G, Wang Y. Low-intensity ultrasound accelerates mandibular implant bone integration in dogs with mandibular osteoradionecrosis. *Journal of Surgical Research* 2013; 182:55-61.

Xu Y, Zhao T, Xu W, Ding Y. Periodontal microstructure change and tooth movement pattern under different force magnitudes in ovariectomized rats: An in-vivo microcomputed tomography study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2013; 143:828-836.

8. ANEXOS

Figura 1

Figura 2

Figura 3

Legenda das figuras:

Figura 1. **A.** Imagem do microtomógrafo SkyScan® do laboratório 3D Bio da FORP-USP utilizado para escanear as amostras desse estudo. **B.** Mandíbula de rato posicionada no porta-amostra. **C.** A peça devidamente colocada no interior do microtomógrafo numa vista frontal e em **D.** visualização da peça por vista oclusal.

Figura 2. Imagens 3D do VOI (volume da área de interesse) na área da furca do M1(primeiro molar mandibular). **A, C e E** aspecto tridimensional do grupo controle; **B, D e F** aspecto tridimensional do grupo DP (doença periodontal).

Figura 3. Imagem escaneada da hemimandíbula dos grupos controle (C) e doença periodontal induzida (DP) nos dois tempos de eutanásia. **A.** Grupo controle - 10 dias; **B.** Grupo DP - 10dias; **C.** Grupo controle - 21 dias; **D.** Grupo DP - 21 dias.

APÊNDICE

9. ARTIGO EM INGLÊS

Use of Micro-Computed Tomography in Morphometric Bi and Three-Dimensional Analyses for Experimental Bone Loss Evaluation in Rats

Authors: Patricia Garani Fernandes, Adriana Luísa Gonçalves de Almeida, Michel Reis Messoria, Marcio Fernando de Moraes Grisi, Sérgio Luís Scombatti de Souza, Daniela Bazan Palioto, Arthur Belém Novaes Jr, Mario Taba Jr.

Background and Objective: Periodontitis is a chronic inflammatory disease that results in periodontium destruction, pocket formation and alveolar bone loss. The aim of this study was to quantify assess alveolar bone loss in a ligature-induced periodontitis (PD) by bi and three-dimensional analyses in a rat model using micro-computerized tomography.

Methods: Forty rats (Spontaneously Hypertensive Rats and normotensive Wistar Kyoto) were divided into control (C) and periodontal disease (PD) groups. Bone loss was measured on the 10th day after ligature placement and 11 days after ligature removal, on the 21th day.

Results: The most representative bi-dimensional parameters to measure bone loss were: Furcation (distance from M1 furcation roof to the bone crest interradicular) and Vestibular (distance from CEJ to vestibular bone crest). 3D parameters representative in detecting alveolar bone loss in this assay were: bone surface and bone volume ratio; bone volume and total volume ratio (in %) and porosity and bone mineral density both given in percent too.

Conclusion: The region chosen and method of analysis have affected the outcome. Thus linear and volumetric measurements of the same sample may have different percentages in relation to bone loss. μ CT was efficient enough to identify the higher bone loss detected in the PD groups when compared to C groups in this model of study.

Key words: bone loss, periodontal disease, micro-computed tomography, histomorphometric analysis, three-dimensional view.

Word count: 2782

Number of figures: 07

The authors report no conflicts of interest related to this study.

Periodontal disease is characterized by an inflammatory process which lead the destruction of tooth-supporting tissues (gingiva, periodontal ligament, root cementum, alveolar bone) culminating with bone loss, the main hallmark feature of periodontitis.

Several methods can be used to measure alveolar bone loss due to periodontitis. Among them, one can find morphometric techniques (simple and efficient techniques in which the distance from the cemento-enamel junction [CEJ] to the alveolar crest [AC] is measured though the capturing of images for evaluation by an image analysis software), radiological examination (visualization of mineralized structures [CEJ and AC] and their proximity relations and loss evaluation), and histological data analysis (observation of mineralized and non-mineralized tissues using microscope slides). The observation of tissues under light microscopy requires tissue transparency and, thus, the observed material must be sliced into extremely thin samples, embedded into paraffin and sliced again with a microtome. After being sliced and the paraffin removed, the sample is placed in a microscope slide and then fixated and stained. The stained slides can then be finally observed under light or electronic microscopy or even under immunofluorescence. (Lindhe et al., 2003; Wilkie et al., 2004; Trisi et al., 2006; Vanderlei et al., 2012).

These methods produce only two-dimensional (2D) imagery, because they measure horizontal bone loss (mesiodistally or buccolingually) and, this way, they cannot render images in three dimensions (3D). Therefore, intrabony changes that may occur during periodontal infection might not be correctly quantified.

In order to better visualize the trabecular bone structure without destroying the evaluated sample, many studies have searched for alternative methods that could

allow such quantification (Genant et al.,1996; Slyfield et al.,2012). Micro-computed tomography (μ CT) can be a more sensitive alternative to measure bone mass and alveolar bone microstructure than the usual conventional methods (Bouxsein et al., 2010; Molon et al., 2013). Because it is a non-destructive technique which generates high resolution spatial 3D images in a micrometric level, it also allows computer-aided reorientation following image digitalization, assuring an alignment very close to reality. Hence, μ CT is capable of showing small alterations both in infrabony defects and bone crest defects (Feldkamp et al., 1989; Park et al., 2007).

Studies of reliability and precision regarding two dimensional radiographs demonstrate differences of up to 25% between calculations and quantifications of alveolar bone from 2D radiographs when compared to 3D images (Fernandes et al., 2007; Ebina et al., 2009; Ferrare et al., 2013). Some advantages of the latter are the ease of choice regarding the region to be evaluated without the necessity of previous sample preparation, sample visualization without interference from stains or technical artifacts and, finally, the maintenance of sample intactness at the end of the scanning (De Smet et al., 2006; Chackartchi et al., 2011). Analyses using high resolution μ CT can be utilized to construct a 3D model of the bone and to evaluate data non-destructively and with high precision.

Considering μ CT a promising analysis tool for assay in alveolar bone, the aim of this study was to compare 2D and 3D morphometric measures through micro-computed tomography in the evaluation of bone loss on experimental periodontal disease in a rat model.

Materials and Methods

Animals

For this study, 20 normotensive male Wistar Kyoto rats (WK) and 20 spontaneously hypertensive rats (SHR) aging from 10-12 weeks were used. The animals came from the Vivarium of the Neurology Department of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto from the University of São Paulo (USP).

Wistar Kyoto normotensive and the spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into ligature-induced periodontal disease groups (PD), and control groups, in which periodontal disease was not induced (C). Each of these 4 groups was further divided into 2 subgroups, according to the euthanasia period, which was carried out on the 10th and 21st days of experimentation, yielding the following situations:

WK + PD euthanized on the 10th day (n=5) and on the 21st day (n=5)

WK + C euthanized on the 10th day (n=5) and on the 21st day (n=5)

SHR + PD euthanized on the 10th day (n=5) and on the 21st day (n=5)

SHR + C euthanized on the 10th day (n=5) and on the 21st day (n=5)

Experimental design and induction of PD

The animals of PD groups were submitted to a general anesthesia by intraperitoneal administration of xylazine (0.3 ml/kg) and ketamine (0.5ml/Kg), and its first mandibular molar received a cotton ligature at baseline. It has previously been shown that placement of the ligature facilitates bacteria-induced inflammation and tissue loss (Bastos et al., 2010; Vanderlei et al., 2012). This experimental periodontitis-induced protocol is widely used in the literature.

After 10 days 5 animals of each group (WKY-C, WKY-PD, SHR-C and SHR-PD) were sacrificed, to evaluating bone loss, and the ligatures of the other animals were removed. On the 21th day of the experiment, 11 days without ligatures, the remaining animals were sacrificed to evaluating bone formation after ligature removal. The animals were sacrificed 10 or 21 days later ligatures placement by an overdose of xylazine and ketamine. Body weight and blood pressure were measured weekly. The systolic blood pressure (SBP) was assessed by tail-cuff pletismography, and rats were considered to be hypertensive when SBP was higher than 150 mmHg. Following sacrifice, the left and right segments of the mandibulae were dissected out and fixed in 10% neutral buffered formalin (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, USA) for 24 hours. The specimens were then immersed in sodium hypochlorite with 9% of active chlorine during 5 hours. Then the specimens were defleshed.

Measurement of alveolar bone level

The samples were scanned in all three spatial planes at a resolution of 12 mm by 1172 model SkyScan® (SKYSCAN N.V., Kontich, Belgium). Each specimen was scanned at an isotropic resolution of 22.5 μ m, a rotational step of 0.70°, a rotational angle of 180° and a 3.1-s exposure time, using a 1-mm-thick aluminum filter. Images of each were reconstructed from apex to the crown including alveolar process bone with dedicated software (NRecon v1.6.1.5) in approximately 120 slices. CTan v1.11 and Data-viewer were used for three-dimensional visualization and qualitative analysis of the external and internal anatomy of the teeth. For micro-CT imaging, hemi-mandible samples were paraformaldehyde-fixed and examined by a desktop micro-CT system.

The scanning of the samples was standardized with isotropic voxel size of 9 microns to 60 kV, 165 μ A, 180 ° rotation angle of 0.6 to 0.5 mm Al filter with an

exposure time of 540 milliseconds or is 0, 5 seconds using an aluminum filter of thickness 0.5 mm. Images of each sample were reconstructed from the apex of the crown, including the process of alveolar bone with the specific software NRECON® v 1.6.3.3 in about 100-120 slices according to the anatomical parameters adopted. CTAN® v 1.10.11.0, DATA VIEWER® v. 1.4.3 and v. 2.0.0.0 CTVOX® softwares were used for three-dimensional visualization and qualitative analysis (quantitative too) of the external and internal anatomy of the teeth and alveolar bone. A range of software for quantitative analysis SkyScan® 2D / 3D and 3D visualization allowed each hemi-mandible of each group were examined by applications and software provided by SkyScan® system.

The samples were positioned and fixed in a specimen holder suitable for the equipment, utility wax, allowing stabilization to prevent any movement during scanning. After scanning, the tomographic projections were reconstructed by a specific software (3D images were generated by NRECON®). DataViewer® was used for visualization and evaluation 2D (linear measurements) of the coronal, transaxial and sagittal axes as well as the definition of the distance from the cemento-enamel junction to the alveolar crest in the buccal and lingual aspects and the interproximal region and furcation. The position of the alveolar crest was determined as the first contact of bone with the root surface; in the sagittal plane, it was possible view the first and second molars, in the coronal plane, the roots were completely separated. After the establishment of an ideal position, analyzes 2D were conducted by one examiner in a masked manner. The measurement of the furcation region was performed utilizing the sagittal axis, while the quantification of bone loss buccal, lingual interproximal was taken and the images in the transaxial axis.

The aim of volumetric analysis (3D) was to characterize the volume of alveolar bone in two distinct regions: interproximal area, between M1 (mandibular first molar) and M2 (mandibular second molar) and M1 furcation area. The rectangle was the geometry chosen to represent the region to be analyzed; i.e., region of interest (ROI). This geometry is suitable for the interpolation area to be measured and obtained a volume of interest (VOI). Therefore, was chosen as top point the slice where the four roots of first molar were clearly visualized. The bottom point was determined as the position where none interradicular bone has been found, thereby delimiting the ROI.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Furthermore, the data were reported as means and standard deviations for the respective linear and volumetric parameters and the experimental unit was the rat. For selection of the appropriate statistical test of homogeneity and homoscedasticity tests were performed. Statistical analysis was performed by applying parametric tests. To compare the results obtained in the control group (C), the test (PD) group and the different periods of euthanasia (10 and 21) the test of analysis of variance (One Way ANOVA) followed by post-test Tukey were applied. For all statistical analyses, significance level was 95% ($p < 0.05$).

Results

Each group had an $n = 5$. Accordingly, if an animal died before the period indicated for euthanasia, a new animal with similar characteristics (age, weight, and

race) was introduced in the study, so that the end of the experimental phase, each of the eight groups maintained five animals.

Bi-dimensional parameters to measure bone loss were: Furcation (distance from M1 furcation roof to the bone crest interradicular); Vestibular (distance from CEJ to vestibular bone crest); Lingual (from CEJ to lingual bone crest); Interproximal (from CEJ of the point of contact between M1 and M2 to alveolar interproximal bone crest). Of all 3D parameters, the most representative in detecting alveolar bone loss in this assay were: bone surface (BS) and bone volume ratio (BV) (1/mm); bone volume (BV) and total volume (VT) ratio (in %) and porosity (PO) and bone mineral density both given in percent too.

The percentage difference between the two assessment methods for the control group (C) and periodontal disease (PD) was calculated and the result is shown in the graph below.

Discussion

The technique 3D illustrates the state of the alveolar bone in a rat model in addition to data on linear and volumetric alveolar bone. In the present study, a new approach was introduced to treat the histomorphometric analyzes. It was also shown that alveolar bone loss occurred in both groups (SHR/ WK rats) with periodontal disease, what suggests that periodontal infection should contribute to the development of loss of bone mass, regardless in the presence or not state of hypertension.

It is established that ligatures can cause significant loss in trabecular alveolar bone, resulting in greater bone loss and deterioration of the alveolar bone microstructure. On the clinical findings of this study in analyzing intra-group, the PD

group showed higher bone loss after 10 days of ligature placement in relation to the C group, indicating that the method was efficient ligation to induce periodontitis. At 21 days, the PD groups showed an increase in accumulated loss of bone mass compared with the control group, indicating that they showed no bone formation during bone repair in this study. This results are in agreement with Bastos et al. who observed that bone loss are in the area of bifurcation, as well as SHR species showed severe changes in alveolar bone, independently of inflammation. Anyway it can be observed that μ CT is a method efficient of detecting bone loss that can be interpreted in various ways depending on the chosen location or site, and also how the analysis is done through the various features applications that method chosen (SkyScan ®-BRUKER) is able to offer.

The most common method of measuring bone loss in animal studies is histological analysis by microscopy. However, this has a limited ability to identify the levels associated with healthy bone tissue and associated with periodontal disease. To minimize this limitation Fernandes et al. (2007) compared the measurement procedures histologic and morphometric bone height and the results which the authors found to perform linear measurements, both histometric (histology) and morphometric analysis are capable of detecting differences in ligature-induced bone height in rats. They are in agreement with our study show that when the histomorphometric analysis through the analysis of micro-CT is able to detect bone loss; not requiring histological study to confirm the data.

The micro-CT system was first introduced by Feldkamp et al. (1989). It has been validated as a method of analyzing 3D (Muller et al., 1998) to demonstrate good correlation between the results of the 3D analysis with established 2D histology. This method of analysis allows 3D measurements of bone density and an

evaluation of the architecture and microstructure of bone, which are important for the estimation of bone strength, for example. Both methods of analysis are useful in the verification of morphometric parameters, but a disadvantage regarding the histological analysis, according to Chackartchi et al. (2011) is that it is based on a quantitative calculus, taken from the central portion of the sample, in contrasting, micro-CT analysis is taken from the total sample volume and, therefore, a more complete way.

Several authors (Kim et al, 2004;. Verdelis et al 2011 Fernandes et al, 2007; Liberman et al, 2010) showed a correlation in the comparative analysis of histometric and morphometric bone height in ligature-induced periodontitis but the results indicate that morphometric measurements should be carefully compared between micro-CT systems for certain conditions, including voxel size and measurements of primary interest are system (manufacturer) adopted. Hence the difficulty when comparing studies. Comparing the results obtained by traditional histomorphometry and micro-CT to analyze the grafting of the maxillary sinus in humans, with Biogran ® and autogenous bone, Trisi and colleagues (2006) found that the values of mineralized bone obtained by both techniques were similar for all samples, with no statistically significant differences. So the values of Tb.Th and Tb.Sp parameters obtained by micro-CT were lower than those obtained with histomorphometry, but no statistically significant difference between them.

Micro-CT has been validated as a method of measurement and analysis in 3D cancellous bone by Mueller et al. (1998) who compared the morphometric results of conventional histomorphometry the results of micro-CT. The authors demonstrated that the strength of the 3D representation of the architecture of trabecular bone compared to the conventional 2D histology showed excellent correlation of the

measured indices. Some investigations (Jin et al., 2007) using the experimental model of ligature-induced periodontitis and 3D micro-CT could provide a better comprehension of the complex ultrastructure bone.

In the present study the difference between the test (ligature-induced periodontal disease) and control groups showed no great variation. Some authors (Lambert et al, 2011; Chackartchi et al, 2011) were able to observe significant differences between control groups and disease/bone defect when grafts were used. Furthermore, 3D reconstruction of the sequence of tomographic images allowed finding a correlation between the 2D sections in the three-dimensional structures.

Several studies (De Smet et al, 2006;. Park et al, 2007; Amar & Li, 2007; Jin et al, 2007; Cantley et al, 2009; Versiani et al, 2011) have used the technique of micro-CT to illustrate with images rich in detail, the trabecular bone structure and even the cortex. In the study of Trisi et al (2006), the 3D reconstructions have been shown as a bone trabecular and allowed visual survey of bone architecture in all parts of the biopsy harvested in surgical procedure.

Recent advances in imaging techniques have allowed the evaluation and analysis of thin bony structures such as trabecular bone, both in vitro and in vivo. Thomsen et al. (2005) found that the data of three-dimensional micro-CT can accurately replace the conventional quantitative histological evaluation of bone. Cowan et al. (2007) demonstrated that quantification of three-dimensional image of the bone volume correlates well with the results of histological analysis.

Based on the results obtained in this study and the literature review we can say that computerized microtomography is an important method of assessment for alveolar bone.

Conclusion

The region chosen and method of analysis have affected the outcome. Thus linear and volumetric measurements of the same sample may have different percentages in relation to bone loss. μ CT was efficient enough to identify the higher bone loss detected in the PD groups when compared to C groups in this model of study.

Figures

Figure 1. Alveolar bone level for the WK and SHR groups. The measurements indicate the average distance between the furcation roof to the interradicular bone crest (µm) of SHR and WK on the 10th and 21st day after ligature placement. The values correspond to 21 days; are 10 days effects induced periodontal disease plus 11 days after removal ligature. The intra-group analysis showed greater bone loss in the PD group compared to C group ($p < 0.05$). The bars represent means $\pm$ standard deviations (µm) of the linear measurement of the mandibular furcation M1. * Level of significance was 95% (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$). SHR: Spontaneously Hypertensive Rats; WK: Wistar Kyoto rats; C: control; PD: ligature-induced periodontal disease.

Figure 2. Alveolar bone level for the WK and SHR groups. The measures indicate the distance between the CEJ-ABC (µm) of SHR and WK the 10th and 21st day after ligature placement. The intra-group analysis showed greater bone loss in the PD group compared to the group C. The PD progression after removal of the bandage between the 10th and the 21th day was observed only in SHR-SD ($p < 0.05$). The bars represent means $\pm$ standard deviations (mM) of the measure CEJ-ABC mandibular M1. * Level of significance was 95% (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

Figure 3: Relation between bone surface (BS) and bone volume (BV) (1/mm) for SHR and WK groups after 10 and 21 days after ligature placement. The measurements indicate the ratio of the surface of the bone with the metered volume VOI in the 3D, a furcation regions (A) and interproximal (B). Also called specific surface is a useful parameter to characterize the thickness and complexity of the bony structures. The intragroup analysis (between 10 and 21 days) showed a statistically significant difference only for WK -DP A. The intergroup analysis (C and PD) showed statistically significant difference in A with SHR at 10 and 21 days; WK at 10 days and B in SHR at 10 and 21 days. The bars represent means $\pm$ standard deviations (mm^{-1}) the proportion SO / VO at the two furcation and interproximal regions . * Level of significance was 95 % (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

Figure 4. Relationship between bone volume (BV) and total volume (TV) measured in percentage for SHR and WK groups after 10 and 21 days after ligature placement. The measures indicate the proportion of the VOI occupied by bone. The intergroup analysis showed a statistically significant difference in all groups in A (furcation area) and SHR groups at 10 and 21 days and 10 days in the WK B (interproximal region). The PD progression after ligature removal between the 10th and the 21st day was not observed. The bars represent means $\pm$ standard deviations (%) proportion of VO / TV in the furcation area and interproximal region. * Level of significance was 95% (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$).

Figure 5: Overall porosity (%) for SHR and WK groups in the furcation area (A) and interproximal region (B). The total porosity is the volume of all pores (open and closed) as a percentage of the total volume of the VOI. The measurements were performed after 10 and 21 days after ligature placement. The inter-group analysis (C and PD) showed statistically significant differences for all groups both for the region and for the region B; WK except at 21 days in the interproximal region. The PD progression after removal of the ligature between the 10th and the 21st day was not only observed in SHR - PD group in the furcation area. The bars represent means $\pm$ standard deviations (%) of the evaluated porosity regions. * Level of significance was 95 % (ANOVA, Tukey $p < 0.05$).

Figure 6: Bone Mineral Density (BMD) for SHR and WK groups in total area (furcation and interproximal). Bone mineral density is the amount of minerals found in bone and can be measured in any bone in the body. The measurements were performed after 10 and 21 days after ligature placement. The values correspond to 21 days 10 days effects induced periodontal disease 11 days after ligation and removal thereof. The inter-group analysis (C and PD) showed statistically significant differences for all groups. The PD progression after ligature removal between the 10th and the 21st day was not observed. A. The graph bars represent means $\pm$ standard deviations (in%) of BMD in the evaluated regions. B. The table shows the numeric values expressed as means $\pm$ standard deviations in percent. * Level of significance was 95 % (ANOVA, Tukey, $p < 0.05$) Means and standard deviations of BMD of the total area of the VOI groups of Wistar Kyoto (WK) and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) with a time of euthanasia at 10 and at 21 days in the control group (C) and periodontal disease (PD).

Figure 7: Percentage difference between the control group (C) and induced periodontal disease (PD) as compared to the two-dimensional or three-dimensional method used.

References

Bastos MF, Brilhante FV, Gonçalves TED, Pires AG, Napimoga MH, Marques MR, Duarte PM. Hypertension May Affect Tooth-Supporting Alveolar Bone Quality: A Study in Rats. *Journal of Periodontology* 2010; 81:1075-1083.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro-Computed Tomography. *Journal of Bone and Mineral Research* 2010; 25;7:1468-1486.

Cantley MD, Bartold PM, Marino V, Reid RC, Fairlie DP, Wyszynski RN, Zilm PS, Haynes DR. The use of live-animal micro-computed tomography to determine the effect of a novel phospholipase A2 inhibitor on alveolar bone loss in an in vivo mouse model of periodontitis. *Journal of Periodontal Research* 2009; 44:317-322.

Chackartchi T, Iezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piatelli A, Shapira L. Sinus floor augmentation using large (1–2mm) or small (0.25–1mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clinical Oral Implant Research* 2011; 22: 473-480.

Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, Walder B, Zhang X, Soo C, et al. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Engineering* 2007; 13:501-512.

De Smet E, Jaecques SVN, Wevers M, Jansen JA, Jacobs R, Vander Sloten J, Naert IE. Effect of controlled early implant loading on bone healing and bone mass in guinea pigs, as assessed by micro-CT and histology. *European Journal of Oral Sciences* 2006; 114: 232-242.

Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, Sasano Y. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. *Oral Diseases* 2009; 15:273-280.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jasion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of Bone Mineral Research* 1989; 4:3-11.

Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Brazilian Oral Research* 2007; 21(3):216-221.

Ferrare N, Leite AF, Caracas HCPM, Azevedo RB, Melo NS, Figueiredo PTS. Cone-beam computed tomography and microtomography for alveolar bone measurements. *Surgical and Radiologic Anatomy* 2013; 35:495-502.

Genant HK, Engelke K, Fuerst T, Gluer CC, et al. Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996; 11; 6:707-730.

Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba Jr M, Kostenuik PJ, Giannobile WV. RANKL Inhibition Through Osteoprotegerin Blocks Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Journal of Periodontology* 2007; 78:1300-1308.

Kim D-G, Christopherson GT, Dong XN, Fyhrie DP, Yeni YN. The effect of microcomputed tomography scanning and reconstruction voxel size on the accuracy of stereological measurements in human cancellous bone. *Bone* 2004; 35:1375-1382.

Lambert F, Léonard A, Drion P, Sourice S, Layrolle P, Rompen E. Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. *Clinical Oral Implant Research* 2011; 22:538-545.

Li CH, Amar S. Morphometric, Histomorphometric, and Microcomputed Tomographic Analysis of Periodontal Inflammatory Lesions in a Murine Model. *Journal of Periodontology* 2007; 78:1120-1128.

Lieberman DN, Pilau RM, Orlandini LF, Gaio EJ, Rösing CK. Comparison of two methods for alveolar bone loss measurement in an experimental periodontal disease model in rats. *Brazilian Oral Research* 2010; 80; 25(1):80-84.

Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical periodontology and implant dentistry. Fourth Edition 2003 by Blackwell Munksgaard, a *Blackwell Publishing Company*.

Molon RS, de Avila ED, Nogueira AV, de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, Cirelli JA. Evaluation of the Host Response in Various Models of Induced Periodontal Disease in Mice. *Journal of Periodontology* 2013; Posted online on June 27, 2013.

Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998; 23:59–66.

Park CH, Abranson ZR, Taba Jr M, Jin Q, Chang J, Kreider JM, Goldstein SA, Giannobile WV. Three-Dimensional Micro-Computed Tomographic Imaging of Alveolar Bone in Experimental Bone Loss or Repair. *Journal of Periodontology* 2007; 78:273-281.

Slyfield CR, Tkachenko EV, Wilson DL, Hernandez CJ. Three-dimensional dynamic bone histomorphometry. *Journal of Bone and Mineral Research* 2012; 27; 2:486-495.

Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W, et al. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *Journal of Microscopy* 2005; 218:171-179.

Trisi P, Rebaudi A, Calvari F, Lazzara RJ. Sinus graft with biogran, autogenous bone, and PRP: a report of three cases with histology and micro-ct. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 2006; 26:113-125.

Trisi P, Rebaudi A, Calvari F, Lazzara RJ. Sinus graft with biogran, autogenous bone, and PRP: a report of three cases with histology and micro-ct. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 2006; 26:113-125.

Vanderlei JMTMM, Messoria MR, Fernandes PG, Novaes JR AB, Palioto DB, Grisi MFM, Souza SLS, Gerlach RF, Antoniali C, Taba Jr M. Arterial hypertension perpetuates alveolar bone loss. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2012; Early Online: 1-5. Acessado em informahealthcare.com em 14/08/12.

Verdelis K, Lukashova L, Atti E, Mayer-Kuckuk P, Peterson MGE, et al. MicroCT morphometry analysis of mouse cancellous bone: Intra- and inter-system reproducibility. *Bone* 2011; 49:580-587.

Versiani MA, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Pulp pathosis in inlayed teeth of the ancient Mayas: a microcomputed tomography study. *International Endodontic Journal* 2011; 1-5.

Wilkie JR, Giger ML, Chinander MR, Vokes TJ, Li H, Dixon L, Jaros V. Comparison of radiographic texture analysis from computed radiography and bone densitometry systems. *Medical Physics* 2004; 31(4):882-891.