SIMONE ORLANDI INTROINI

**Avaliação do Reparo Tecidual em Defeito Ósseo
por Microtomografia Tridimensional por Raio X**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. José Marcos Alves

SÃO CARLOS

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

I61a

Introini, Simone Orlandi

Avaliação do reparo tecidual em defeito ósseo por
microtomografia tridimensional por raio x / Simone
Orlandi Introini ; orientador José Marcos Alves. -- São
Carlos, 2011.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração Interunidades em Bioengenharia) -- Escola
de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2011.

1. Microtomografia tridimensional. 2. Reparo ósseo.
3. Calo ósseo. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

SIMONE ORLANDI INTROÍNI
MESTRADO EM CIÊNCIAS
ÁREA DE BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC - FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 11/7/11

JOSÉ MARCOS ALVES (Presidente)

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: [Assinatura]

BEN HUR VIANA BORGES

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: [Assinatura]

ORIVALDO LOPES DA SILVA

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Resultado: aprovado

Assinatura: [Assinatura]

**Dedico a minha mãe Maria do Carmo
Orlandi por nunca me deixar desistir
e principalmente por seu amor
incondicional.**

**“O essencial é invisível aos olhos,
é com o coração que se vê corretamente.”**

Antonie de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Maria do Carmo Orlandi por nunca desacreditar e se manter ao meu lado em todas as fases da minha vida.

À minha irmã Gisele Orlandi Introini por sempre me mostrar o melhor caminho, mesmo eu desviando um pouco dele.

Maria José Resende e à Inês Hermenegildo pela amizade, consideração e apoio constantes.

Ao Apolo Orlandi por existir na minha vida e com sua doçura me fazer aprender a ser uma pessoa melhor a cada dia que passo ao seu lado.

Bruno Augusto de Andrade por aparecer sem ser chamado e mostrar que era esperado há tempos.

Ao Gil Nobre Introini “*In Memoriam*” por inconscientemente me fazer aprender que quando tudo poderia ser mais fácil com esforço tudo tem um “sabor” bem melhor.

Agradeço ao Prof. Dr. José Marcos Alves pela minha orientação e a CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos engenheiros Luiz Matteo e Paulo Lasso da EMBRAPA São Carlos por toda ajuda na aquisição e reconstrução das minhas imagens ósseas.

À Danielle Silva pela amizade, passeios, risadas e diversas conversas “construtivas”.

À aluna Jaqueline Crusca do PPGIB – USP pela disposição em ajudar e pelas suturas perfeitas.

À secretária Janete do PPGIB - USP por sempre me atender na secretaria, mesmo em horários de não funcionamento.

Aos coordenadores do biotério da UNESP de Araraquara pela disponibilização dos animais para o meu estudo.

Ao Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva por todas as conversas das quais pude tirar muito conhecimento de forma agradável e delicada.

Ao biólogo Nelson Ferreira da Silva do PPGIB – USP pelas diversas broncas, piadas, conversas, ensinamentos, amizade e acima de tudo por nunca me deixar esquecer o FOCO.

RESUMO

INTROINI, S. O. **Avaliação do Reparo Tecidual em Defeito Ósseo por Microtomografia Tridimensional por Raio X**. 2011. 72f. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

A fratura é uma descontinuidade óssea que pode ser produzida cirurgicamente ou causada por um impacto que excede a resistência mecânica do osso dando início a uma sequência de eventos sistêmicos e específicos de resposta do tecido. Exames radiológicos são comumente realizados na clínica e em experimentos com animais para o monitoramento do reparo ósseo dando informações sobre o alinhamento dos fragmentos e da evolução de reparo. Outras técnicas de monitoramento qualitativas e quantitativas podem ser utilizadas em experimento animal (histologia e ensaios mecânicos) e em experimento animal e clínico (tomografia computadorizada por raio X, ressonância magnética, ultra-sonografia). A microtomografia 3D por raio X é uma nova técnica de monitoramento para uso em experimento animal e com grande potencialidade. A quantificação do reparo ósseo com novas metodologias tem larga aplicação em investigações sobre técnicas invasivas e não-invasivas de tratamento de fraturas utilizando-se experimento animal. O objetivo dessa investigação foi a utilização da microtomografia 3D por raio X policromático (μ CT) para a avaliação do reparo ósseo em defeito ósseo na tíbia direita de rato macho da raça Wistar com peso aproximado de 280g. O defeito foi produzido por uma broca odontológica com alta rotação. Foram estabelecidos quatro grupos experimentais caracterizados pela utilização ou não utilização do tratamento do defeito por ultra-som pulsado de baixa intensidade (LIPUS, 30 mW/cm²) e pela duração do experimento. No grupo 1 o tratamento por ultra-som teve a duração de 14 dias, 5 sessões de tratamento por semana. No grupo 2 não houve tratamento por ultra-som e a duração foi de 14 dias. No grupo 3 o tratamento por ultra-som teve a duração de 21 dias, 5 sessões de tratamento por semana. No grupo 4 não houve tratamento por ultra-som e a duração foi de 21 dias. Nos grupos 1 a 4 foram utilizados 10 animais para a avaliação por μ CT. O defeito ósseo da tíbia direita nos animais dos grupos 1 e 3 foi tratado com ultra-som de baixa intensidade. A avaliação por μ CT foi realizada através dos softwares NRecon, Data Viewer, CT-Analyzer e CT-Vol fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo (Skyscan, Bélgica). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na quantificação do reparo ósseo dos defeitos dos grupos 1 e 2 e dos grupos 3 e 4.

Palavras-chaves: Microtomografia tridimensional, reparo ósseo, calo ósseo.

ABSTRACT

INTROINI, S. O. **Evaluation of tissue repair after bone fracture using 3D X-ray microtomography**. 2011. 7f. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Fracture is a bone discontinuity that can be surgically produced or caused by an impact that exceeds the mechanical strength of bone by initiating a series of systemic events and specific tissue response. Radiological tests are commonly performed in clinical and animal experiments for monitoring the bone healing by providing information about the alignment of the fragments and the evolution of repair. Other techniques for monitoring quality and quantity can be used in experimental animals (histology and mechanical tests) and in animal experiments and clinical studies (computed tomography X-ray, MRI, ultrasound). The 3D microtomography by X-ray is a new monitoring technique for use in animal experiment and with great potential. The quantification of bone repair with new methods has wide application in research on invasive and noninvasive treatment of fractures using animal experiment. The goal of this research was to use the 3D microtomography by non monochromatic X-ray (μ CT) to evaluate the bone healing in bone defect in the tibia of Wistar male rat weighing approximately 280g. The defect was produced by a dental drill with high speed. It was established four experimental groups characterized by the use or non use of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS, 30 mW/cm^2) for the bone defect treatment as well as the duration of the experiment. In group 1 the LIPUS treatment last 14 days, 5 treatment sessions per week. In group 2 the LIPUS treatment was not used and the duration was 14 days. In group 3 the LIPUS treatment last 21 days, 5 treatment sessions per week. In group 4 the LIPUS treatment was not used and the duration was 21 days. In groups 1 to 4, 10 animals were used for evaluation by μ CT. The evaluation was conducted by μ CT through software NRecon, Data Viewer, CT-Vol and CT-Analyzer supplied by the microtomography manufacturer (SkyScan, Belgium). No significant statistical differences were found between the results of groups 1 and 2 as well as the results of groups 3 and 4.

Keywords: X-ray microtomography, fracture healing, bone callus.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	Fotomicrografia de osteoblastos digerindo a matriz óssea 15
Figura 2	Ilustração da reabsorção óssea 17
Figura 3	Ilustração mostrando sistema de Havers e a direção das fibras colágenas 17
Figura 4	Tecidos envolvidos na cicatrização do defeito ósseo 19
Figura 5	Ilustração da reparação da fratura 20
Figura 6	Reparo de uma fratura - 1º dia após a fratura 20
Figura 7	Reparo de uma fratura - 7º dia após a fratura 21
Figura 8	Reparo de uma fratura - 14º dia após a fratura 21
Figura 9	Reparo de uma fratura - 21º dia após a fratura 22
Figura 10	Ilustração da ossificação intra-membranosa 23
Figura 11	Reparo de uma fratura - 28º a 35º dias após a fratura 23
Figura 12	Síntese de proteínas e fatores de crescimento 27
Figura 13	Figura esquemática do princípio da tomografia 30
Figura 14	Projeções e seções transversais do membro inferior de um rato 30
Figura 15	Modos de interação raio-x com a matéria 32
Figura 16	<i>Thresholding</i> global de seções transversais de amostras ósseas 34
Figura 17	influência da espessura na medida da densidade 36
Figura 18	Endurecimento de feixe policromático 36
Figura 19	Influência da espessura do material em volta de um objeto na qualidade da imagem 37

	Pág.
Figura 20 Componentes de um microtomógrafo	38
Figura 21 Etapas da microtomografia computadorizada por raios-X	39
Figura 22 Tricotomia pré-operatória	43
Figura 23 Separação dos músculos com auxílio do bisturi.	43
Figura 24 Exposição do terço médio da tíbia	44
Figura 25 Uso da broca odontológica para a produção do defeito ósseo	44
Figura 26 Fissura transversal no platô da tíbia	45
Figura 27 Estimulador Ultra-Sônico da Regeneração Óssea	45
Figura 28 Dosímetro de ultra-som	46
Figura 29 Dispositivo de imobilização animal para o tratamento por ultra-som	46
Figura 30 Microtomógrafo por raio-X de alta resolução	47
Figura 31 Phantoms de hidroxiapatita	48
Figura 32 Projeção e secção transversal de um phantom	49
Figura 33 Determinação da secção transversal inferior da VOI	49
Figura 34 Determinação da secção transversal superior da VOI	50
Figura 35 Escolha da região de interesse (ROI) na secção transversal do phantom	50
Figura 36 Superposição da região de interesse (ROI) na secção transversal do phantom	51
Figura 37 Binarização dos tons de cinza	51
Figura 38 Escolha da seção transversal proximal da VOI para uma amostra óssea	53
Figura 39 Escolha da seção transversal media da VOI para uma amostra óssea	54

	Pág.
Figura 40 Escolha da seção transversal distal da VOI para uma amostra óssea	54
Figura 41 Secção transversal contendo o tecido de reparo do defeito ósseo no 14º dia pós-cirúrgico	55
Figura 42 ROI de uma seção transversal da VOI onde há presença do calo ósseo	55
Figura 43 Binarização de uma das seções transversais da VOI	56
Figura 44 Imagem de uma seção transversal da VOI antes da segmentação	56
Figura 45 Imagem do tecido neoformado em uma das seções transversais da VOI	57
Figura 46 Reparo ósseo da tíbia de animal do grupo experimental 1 (14 dias em tratamento), vista transversal , sagital e coronal	59
Figura 47 Reparo ósseo da tíbia de animal do grupo experimental 2 (14 dias sem tratamento), vista transversal , sagital e coronal	60
Figura 48 Reparo ósseo da tíbia de animal do grupo experimental 3 (21 dias em tratamento, vista transversal , sagital e coronal	60
Figura 49 Reparo ósseo da tíbia de animal do grupo experimental 3 (21 dias sem tratamento), vista transversal, sagital e coronal	61
Figura 50 Visualização 3D de um calo ósseo de tíbia tratada por ultra-som durante 14 dias	61
Figura 51 Visualização 3D de um calo ósseo de tíbia não tratada por ultra-som durante 14 dias	62
Figura 52 Percentual de volume ósseo mineralizado no calo das amostras do grupo experimental 1	64
Figura 53 Percentual de volume ósseo mineralizado no calo das amostras do grupo experimental 2	64
Figura 54 Densidade mineral volumétrica do calo das amostras do grupo experimental 1	65
Figura 55 Densidade mineral volumétrica do calo das amostras do grupo experimental 2	65
Figura 56 Valor médio da relação BV/TV dos grupos experimentais 1 e 2	66
Figura 57 Valor médio da densidade mineral óssea volumétrica dos grupos experimentais 1 e 2	66

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Caracterização das células ósseas	16
Tabela 2 Grupos Experimentais	42
Tabela 3 Parâmetros morfométricos do tecido neoformado no grupo experimental com tratamento por ultra-som de 14 dias	63
Tabela 4 Parâmetros morfométricos do tecido neoformado no grupo experimental sem tratamento por ultra-som durante 14 dias	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

USP	Universidade de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
μTC	Microtomografia computadorizada
CCD	Dispositivo de carga acoplado (<i>Charge-coupled device</i>)
ROI	Região de interesse do objeto nas secções microtomográficas
VOI	Volume de interesse do objeto
CT	Tomografia computadorizada
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
BMD	Densidade mineral óssea
TV	Volume total do calo
BV	Volume do calo ósseo mineralizado
LIPUS	Low intensity pulsed ultrasound

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Esqueleto	14
2.2 Crescimento e Remodelação Óssea	16
2.3 Reparos de Fraturas	18
2.4 Estimulação Ultra-Sônica da Regeneração Óssea	24
2.5 Microtomografia Tridimensional para Quantificação do Reparo Ósseo	28
2.5.1 Introdução	28
2.5.2 Microtomografia	29
2.5.2.1 Análise Morfométrica	33
2.5.2.2 Calibração da Análise Morfométrica por Microtomografia	34
2.5.2.3 Análise de Densidade Óssea por Microtomografia	35
3. OBJETIVO	41
4. MATERIAL E MÉTODO	42
4.1 Cirurgia dos Animais	43
4.2 Tratamento por Ultra-som	45
4.3 Quantificação do Reparo Ósseo por Microtomografia 3D	47
4.4. Análise Estatística	58
5. RESULTADOS	59
5.1 Visualização 2D do Reparo Ósseo	59
5.2 Visualização 3D do Reparo Ósseo	61
5.3 Quantificação do calo ósseo	62
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

Os ossos formam a estrutura do esqueleto e são responsáveis pelo sistema de alavancas e deslocamento, compondo assim o sistema músculo-esquelético. Estão também diretamente ligados ao suporte e proteção de tecidos moles e órgãos vitais, como coração, pulmões e sistema nervoso central (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

Quando há uma descontinuidade desse tecido ocorre uma fratura, causada por uma excessiva carga que ultrapassa a resistência mecânica do osso. A palavra fratura tem origem latina “fractura” que significa quebrar. Os ossos estão expostos a diversos fatores e cargas capazes de modificar sua estrutura e suas características biológicas (VELLOSO, 2005).

A cicatrização de uma fratura é um processo que geralmente ocorre com sucesso, porém as fraturas causam prejuízo econômico para a sociedade, tanto em gastos para cuidados de saúde como em perda de produtividade. Por esse motivo atualmente há um enorme aumento em estudos que investigam a capacidade de intervenção para acelerar o processo de cicatrização da fratura (NYMAN et al., 2009).

Está cientificamente comprovado que a estimulação ultra-sônica é capaz de acelerar a regeneração óssea e tem o benefício de ser um tratamento não-invasivo de fraturas (DUARTE, 1983; HECKMAN et al. 1994; EINHORN, 1996; KRISTIANSEN et al., 1997; WARDEN et al., 2000; HANNOUCHE et al., 2001, RUBIN et al., 2001).

A microtomografia computadorizada está sendo utilizada por um número cada vez maior em laboratórios de investigação sobre a osteoporose e outras pesquisas que envolvem tecido ósseo. A tomografia computadorizada é caracterizada por utilizar projeções de imagens de raios X em diversos ângulos de um objeto e matematicamente transformar este conjunto de projeções em imagens das seções transversais do objeto que possibilitam a sua visualização 3D. Estas imagens de projeção são realizadas de forma incremental ao longo de uma rotação de 180° ou 360° (SALMON, 2000). As projeções de raios X são imagens 2D e a rotação da amostra em relação à fonte de raios X e a câmera permite a localização precisa dos objetos a serem calculados para a digitalização 3D. Nessa investigação optou-se por utilizar a técnica de microtomografia para a quantificação do calo ósseo com o objetivo de aprendizado dessa moderna técnica de caracterização do reparo ósseo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esqueleto

O esqueleto é formado por tecido conjuntivo especializado que apresenta uma grande resistência e um peso mínimo (KERR, 2000).

O tecido ósseo proporciona forma e resistência aos ossos e constitui a maior parte do esqueleto humano. Além de ser fisicamente rígido, é uma estrutura dinâmica e ágil, que constantemente está exposto a alterações locais e metabólicas no decorrer de sua formação, demonstrando capacidade de alterar a sua forma e estrutura em resposta a mudanças externas. (VELLOSO, 2005).

O esqueleto possui diversas funções de extrema importância, como proteção para órgãos e sistema nervoso, sustentação e conformação do corpo, armazenando íons cálcio e potássio, além de ser local para a produção de células sanguíneas (DANGELO & FATTINI, 2003). O tecido ósseo é formado por material extracelular calcificado, a matriz óssea, os osteócitos, que se encontram em cavidades no interior da matriz, os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e se situam na sua periferia (fig. 1), e os osteoclastos, células enormes, que se movimentam e são multinucleadas responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, ajudando assim nos processos de remodelação óssea. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

O osso forma-se por 90% de matriz extracelular e 10% de água, por peso. A matriz é 60-70% mineral inorgânica (fosfato de cálcio microcristalino, sódio, magnésio e fluoreto entre outros íons). O colágeno tipo I (90%) e as proteínas não colagenosas (glicosaminoglicanas e outras) são os componentes orgânicos da matriz (KERR, 2000).

Os ossos são formados por células e matriz que possuem suplementação neurovascular. A constituição óssea abrange a síntese de uma matriz orgânica inicial (não calcificada ou não mineralizada), abundante em colágeno – osteóide – que se transforma em osso calcificado ou em osso mineralizado (KERR, 2000).

O tecido ósseo tem como origem embrionária células indiferenciadas do mesênquima, as quais apresentam aptidão de originar os diversos tecidos mesenquimais, como o conjuntivo, cartilaginoso, adiposo, muscular, mucoso e o hematopoiético (MOTA, 2008).

Fig. 1 - Fotomicrografia de osteoblastos digerindo a matriz óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008)

Os ossos são formados por células e matriz que possuem suplementação neurovascular. A constituição óssea abrange a síntese de uma matriz orgânica inicial (não calcificada ou não mineralizada), abundante em colágeno – osteóide – que se transforma em osso calcificado ou em osso mineralizado, é formado por 90% de matriz extracelular e 10% de água, por peso. A matriz é 60-70% mineral inorgânico (fosfato de cálcio micro-cristalino, sódio, magnésio e fluoreto entre outros íons). O colágeno tipo I (90%) e as proteínas não colagenosas (glicosaminoglicanas e outras) são os componentes orgânicos da matriz (KERR, 2000).

O osteoblasto tem um domínio metabólico no tecido através da mineralização da matriz assim como do amadurecimento e da atividade e diferenciação osteoclástica, possuindo assim uma enorme importância na substituição tecidual fisiológica e na osteogênese estendida a cicatrização de fraturas (MOTA, 2008).

A tabela 1, pg. 16, descreve as diferentes células ósseas.

2.2 Crescimento e Remodelação Óssea

O tecido ósseo é um tecido sólido submetido de forma contínua a diversos estresses mecânicos que condicionam sua arquitetura estrutural e o seu crescimento. O osso se adapta aos estímulos mecânicos por atrofia e hipertrofia, modificando e determinando a arquitetura do esqueleto. A Lei de Wolff estabelece uma relação entre o crescimento ósseo e os estresses sofridos por este, ou seja, entre o poder do osso de se adaptar às modificações (de tamanho, estrutura e forma) e variações dos estresses mecânicos impostos a esse tecido (DINIZ et al., 2005).

Tabela 1 - Células ósseas (MOTA, 2008)

Célula	Função	Morfologia	Localização
Osteoblasto	Síntetiza proteínas para determinação da estrutura da matriz.	Núcleos basofílicos e arredondados (em atividade). Achatados (em repouso).	Superfície da matriz.
Osteoclasto	Reabsorve a matriz orgânica e da proção mineral.	Célula gigante, formato irregular.	Superfície da matriz extracelular mineralizada
Osteócito	Manutenção e captação de íons.	Núcleos basófilos com forma oval e prolongamentos celulares finos.	No interior da matriz extracelular mineralizada.

O crescimento ósseo é determinado pela formação de tecido ósseo novo e pela reabsorção de tecido pré-existente. Nos ossos longos o tamanho das epífises aumenta pelo crescimento radial da cartilagem, seguido por ossificação endocondral. O tamanho da diáfise cresce em extensão pela atividade dos discos epifisários e em espessura devido à formação de tecido ósseo na superfície externa da diáfise, com reabsorção na superfície interna. Esta reabsorção aumenta a dimensão transversal do canal medular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

A remodelação é caracterizada pela remoção e substituição do tecido ósseo sem nenhuma modificação em sua estrutura geral. A modelação representa as alterações em forma por reabsorção e aposição do osso pelo periósteo e/ou endósteo (KERR, 2000). A reabsorção óssea acontece quando as enzimas dos lisossomos e íons de hidrogênio produzidos por osteoclastos são levados para um micro ambiente fechado e ácido que

torna mais fácil a dissolução de minerais. A matriz é retirada e levada pelo citoplasma dos osteoclastos e os seus produtos são levados aos capilares do sangue (fig 2). (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990)

A formação de canais de Havers primários é causada pela capacidade do novo osso em formar cristas e pontes. Ao longo da vida esses canais (fig. 3) são parcialmente trocados por novos canais. Isso acontece por canais de reabsorção que infiltram túneis por um osso preexistente com a finalidade de serem preenchidos por osso novo, formando assim novos canais de Havers ligados entre si por canais vasculares oblíquos chamados de canais de Volkmann (KERR, 2000)

Fig. 2 - Ilustração da reabsorção óssea (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008)

Fig. 3 - Ilustração mostrando sistema de Havers e a direção das fibras colágenas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008)

A remodelação é uma atividade dinâmica que está constantemente ativada, estimulada por impulsos hormonais e bio-funcionais. A remodelação ampara a estrutura e restaura os defeitos no esqueleto adulto, substituindo tecidos velhos por tecidos novos sem mudar a arquitetura ou o tamanho dos ossos (FRIEDLAENDER & LIEBERMAN, 2005).

Segundo MOTA (2008) “o modelamento é a atividade de deposição e reabsorção inicial que desencadeia bioquimicamente uma reação contínua, ou seja, ocorre primariamente no desenvolvimento do esqueleto. A ativação neste momento biológico é independente da formação e reabsorção prévia. Por outro lado, o remodelamento é a modificação e/ou reestruturação de osso já existente em um fenômeno combinado possibilitando a renovação do osso já formado”.

2.3 Reparos de Fraturas

As fraturas podem ter como significado e definição a perda da continuidade do tecido ósseo, causada por uma carga exagerada que ultrapassa a capacidade de resistência do osso ou através de um processo de fadiga da estrutura de um osso (VELLOSO, 2005). Ao ocorrer uma fratura inicia-se uma sequência de respostas específicas do tecido que tem como objetivo final no processo de reparo uma completa restauração da competência mecânica do osso (KRISTIANSEN et al., 1997).

Quando não há a utilização de uma fixação interna rígida, micro movimentos ocorrem no local da fratura causando um reparo com formação óssea intramembranosa e endocondral tendo uma significativa participação do periósteo e dos tecidos moles externos (Fig. 4) (EINHORN, 2005).

No local da fratura ocorre uma hemorragia resultante do rompimento de vasos sanguíneos e da morte de células ósseas, como também da destruição da matriz. Os macrófagos são os responsáveis pela retirada dos restos celulares, dos restos da matriz e do coágulo sanguíneo que gera o início do processo de reparação (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

Ao redor da fratura se forma um aglomerado (*cluster*) de células osteoprogenitoras que se introduzem dentre as extremidades ósseas com lesão. Nesse anel conjuntivo, tanto quanto no conjunto que se localiza entre as extremidades ósseas

fraturadas, emerge tecido ósseo primário ou imaturo, pela ossificação endocondral de pequenos pedaços de cartilagem formados no local, e também por ossificação intramembranosa. Podem-se encontrar no local de reparação algumas áreas de cartilagem de ossificação endocondral. Esse processo evolui de maneira a apresentar, decorrido algum tempo, um calo ósseo que envolve a extremidade dos ossos com fratura. O calo ósseo é constituído por tecido ósseo imaturo que liga transitoriamente as extremidades do osso fraturado (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

Fig. 4 - Tecidos envolvidos na cicatrização do defeito ósseo (EINHORN, 2005).

Existem quatro fases diferentes que são traçadas no processo de reparação das fraturas (Fig. 5) A primeira (fase inflamatória) abrange a estabilização interfragmentária com a formação de um calo periostal e endostal, em consequência do processo de diferenciação da fibrocartilagem do foco da fratura, e é conhecido como fase do calo ósseo mole. A segunda fase é simbolizada pela fase de restauração do foco de fratura quando acontece uma reorganização celular intensa e uma nova formação de outro arcabouço ósseo, sendo chamada de fase do calo duro. A terceira fase tem como característica a troca das áreas de necrose por osso novo, realizada pelo sistema haversiano do osso compacto. Na última fase acontece a remodelagem do osso com a reconstrução da sua arquitetura e da sua forma com objetivo de conseguir uma adequação funcional das forças que interferem sobre o tecido ósseo local. O final do processo equivale a uma união óssea e significa uma recomposição completa da lesão do osso (VELLOSO, 2005).

A fase inflamatória ajuda na função de imobilização por apresentar dor e edema (Fig. 6). Os primeiros 7 à 10 dias envolvem o processo de condrogênese levando ao desenvolvimento da cartilagem adjacente no local da fratura e da formação de osso diretamente de células osteoprogenitoras presentes no periósteo (Fig. 7). Uma resposta inflamatória transporta ao local da fratura uma propagação de macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos que secretam citocinas pró-inflamatórias (EINHORN, 2005).

Fig. 5 - Desenhos ilustrativos da reparação da fratura através da formação de tecido ósseo novo a partir do periósteo e do endósteo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008)

Fig. 6 - Reparo de uma fratura no 1º dia após o trauma (EINHORN, 2005)

Fig. 7 - Condrogênese e formação de osso a partir do periósteo no 7º dia após a fratura (EINHORN, 2005)

Após 14 dias ocorre uma maior formação de osso sob o periósteo (Fig. 8) e a cartilagem começa a se calcificar.

Fig.8 - Cartilagem calcificada e formação de osso a partir do periósteo no 14º dia após a fratura (EINHORN, 2005)

No 21º dia do reparo ósseo animal, que corresponde a cerca de 4 ou 5 semanas em um ser humano, a fratura está bem unida (Fig. 9). O calo é composto principalmente de cartilagem calcificada que deve ser removida e substituída por osso. Este tecido se torna alvo de condroblastos multinucleados que são células especializadas na reabsorção dos tecidos calcificados. Os condroblastos degradam a cartilagem calcificada, enviando

um sinal que permite que vasos sanguíneos penetrem no tecido e tragam células-tronco mesenquimais que se diferenciam em células osteoprogenitoras e em osteoblastos.

A remoção de cartilagem calcificada não inclui apenas a reabsorção da matriz mineralizada, mas também a remoção dos condrócitos.

Fig. 9 - Calo principalmente formado por cartilagem calcificada no 21º dia após a fratura (EINHORN, 2005)

Condroblastos e osteoblastos, recrutados pela proliferação e diferenciação celular, formam cartilagem e diretamente depositam osso por formação intra-membranosa do osso. Em alguma distância da linha da fratura a formação do calo periosteal começa pela direta aposição de novo osso. O desenvolvimento do calo está associado com um aumento da estabilidade da fratura. Mais solidificação é alcançada pela conversão de calo cartilaginoso para esponjosa primária ou tecido ósseo por ossificação endocondral juntamente com formação óssea intra-membranosa (fig.10). No estágio final do reparo indireto, o tecido ósseo é substituído por osso lamelar, substituindo assim a forma original do osso (KRISTIANSEN et al., 1997).

Entre 28 e 35 dias (Fig. 11) existe uma combinação de cartilagem calcificada e formação de tecido ósseo novo. Neste período os osteoclastos preenchem o tecido e remodelam o calo, transformando-o em uma estrutura óssea lamelar capaz de suportar cargas mecânicas.

Fig. 10 - Ilustração mostrando a ossificação intramembranosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008)

Fig. 11- Cartilagem calcificada e osso neoformado no 28º a 35º dias após a fratura (EINHORN, 2005)

As tensões mecânicas exercidas sobre o osso durante a reparação da fratura causam a remodelação do calo ósseo e sua completa substituição por tecido ósseo secundário ou lamelar. Ao contrário dos outros tecidos conjuntivos, o tecido ósseo, apesar de ser rígido, possui a capacidade de se reparar sem a formação de cicatriz (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1990).

2.4 Estimulação Ultra-Sônica da Regeneração Óssea

Uma síntese do desenvolvimento da tecnologia de tratamento de fratura por ultra-som de baixa intensidade e dos resultados observados em estudos animais e clínicos foi publicada em uma revisão de literatura sobre a ação de agentes físicos no metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos (LIRANI, 2005). Nesta revisão a autora descreve que Fukada e Yasuda (1957) constataram a piezoeletricidade do osso e estimularam Duarte (1977, 1983) a preconizar o uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade (LIPUS - low intensity pulsed ultrasound) para acelerar o reparo ósseo com base na semelhança do estresse mecânico produzido pelo esqueleto durante a ambulação natural. O processo do reparo de fraturas começa quando os restos celulares e coágulos sanguíneos são removidos por macrófagos, e há proliferação de endóstio e perióstio próximo ao local da fratura formando um colar conjuntivo que dá origem a um tecido ósseo imaturo por ossificação endocondral e intramembranosa formando então o calo ósseo. As cargas corporais determinam a remodelação do calo fazendo com que o tecido ósseo primário seja reabsorvido por osteoclastos e substituído por tecido ósseo lamelar formado por osteoblastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990). Muitos trabalhos experimentais (DUARTE, 1977; TAKIKAWA, 2001; YANG 1996) e clínicos (DUARTE, 1983; HECKMAN et al, 1994; KRISTIANSEN et al. 1997) foram publicados desde então e, atualmente, esta modalidade terapêutica é bem estabelecida, aprovada pelo FDA americano e amplamente utilizada mundialmente.

Segundo Duarte (1983), o ultra-som pulsado atinge o tecido ósseo por uma sucessão de impulsos, cada um deles resultando em um sinal elétrico como resposta do osso. Daí por diante o processo de formação do osso é regulado pelo campo elétrico assim formado e o metabolismo ósseo é estimulado eletricamente. No entanto, o mecanismo de interação do ultra-som com o tecido ósseo ainda é alvo de especulação científica, pois há autores que acreditam que o ultra-som possa exercer uma força mecânica nas células de tecidos moles no local da fratura (TAKIKAWA, 2001), ou que as ondas de pressão geradas pelo ultra-som possam mediar a atividade biológica diretamente pela deformação mecânica da membrana celular ou, indiretamente, pelo efeito elétrico causado por esta deformação (HECKMAN et al. 1994).

Existem evidências de que campos elétricos variáveis, com frequência semelhante àquela do ultra-som utilizado em estimulação de formação óssea, produzem aumento na incorporação de cálcio iônico intracelular em culturas de células ósseas, através da ativação de canais de transporte de cálcio do tipo L (sensíveis à variação de tensão elétrica) presentes na membrana plasmática (SILVA; REINBOLD; POLLACK, 1993). Mais tarde, foi determinado que os canais de transporte de cálcio do tipo L são mecano-sensíveis, ou seja, respondem a estímulos mecânicos (DUNCAN; HRUSKA, 1994; CHEN et al. 2000).

Através de histomorfometria óssea demonstrou-se que a estimulação ultra-sônica pode acelerar a regeneração trabecular óssea em fêmures de ratos *in vitro* (SUN et al. 1999), em tíbias de ratos *in vivo* com fratura recente (LIRANI, 2005) e em modelo experimental de não-união de fratura de tíbia de ratos (GEBAUER et al. 2002).

Chang et al. (2002) investigaram os efeitos do ultra-som pulsado e de microondas no reparo de fraturas em coelhos e obtiveram aumento na neoformação óssea e na resistência à torsão apenas no grupo tratado com ultra-som, o que os permitiu afirmar que não foi o efeito térmico que estimulou a formação óssea.

Em modelo experimental de pseudartrose de tíbia de ratos (TAKIKAWA, 2001) o ultra-som pulsado de baixa intensidade foi utilizado com sucesso para acelerar o processo de reparo ósseo. Após seis semanas de tratamento diário (20 minutos por dia), 50% das fraturas tratadas foram consolidadas, enquanto nenhuma fratura do grupo controle obteve cura neste intervalo de tempo. O ultra-som também pode melhorar as propriedades mecânicas de ossos fraturados de ratos diabéticos, como demonstrado em um estudo de Gebauer et al. (2002).

Wang et al.(1994), em modelo de fratura de fêmur de rato, demonstraram um aumento da resistência mecânica do calo ósseo tratado por ultra-som de baixa intensidade (30 mW/cm^2 , 1.5MHz ou 0,5MHz). Yang et al. (1996) observaram que o reparo ósseo estimulado pelo ultra-som de baixa intensidade (50 mW/cm^2 ou 100mW/cm^2 , 0,5MHz), em modelo de fratura de fêmur de rato, é caracterizado pelo aumento da massa mineral óssea, aumento da resistência mecânica, diminuição do tempo de consolidação óssea e estímulo da formação cartilaginosa precoce, o que possibilitou o início, também precoce, da formação óssea endocondral. Nos estudos de Wang e Yang o tempo de tratamento com ultra-som foi de 21 dias utilizando-se um

modelo de osteotomia total do fêmur e estabilização com osteosíntese (fixação intramedular).

Diversos estudos clínicos comprovaram a eficácia do ultra-som no reparo ósseo, como o de Heckman et al. (1994), que verificaram seu efeito na cura de fraturas diafisárias de tíbia de 66 pacientes como um complemento ao tratamento ortopédico convencional. O tratamento se iniciava 7 dias após a fratura e consistia em uma aplicação diária de 20 minutos por 20 semanas ou até que o avaliador considerasse a fratura curada. Ao final do tratamento houve uma diminuição estatisticamente significativa no tempo total de cura clínica e radiológica no grupo tratado. Cento e vinte dias após a fratura, 88% das fraturas do grupo tratado estavam cicatrizadas, comparadas com 44% do grupo placebo.

Um estudo clínico multicêntrico, prospectivo, randomizado e duplo-cego com controle placebo foi conduzido por Kristiansen et al. (1997) para testar a eficácia do LIPUS na redução do tempo de cura radiológica de fraturas de rádio que foram tratadas com manipulação e gesso. Trinta pacientes receberam o tratamento que se iniciou sete dias após a fratura e foi realizado por 20 minutos diários por 10 semanas, e outros trinta pacientes receberam tratamento placebo. O tempo de reparo foi significativamente menor no grupo tratado: 61 ± 3 dias comparado com 98 ± 5 dias no grupo placebo.

Ambos os estudos de Heckman et al.(1994) e Kristiansen et al.(1997) obtiveram uma redução de 38% no tempo de reparo das fraturas com a utilização da estimulação ultra-sônica quando comparados aos grupos não tratados.

Outras investigações clínicas comprovaram o sucesso do uso do LIPUS para tratar fraturas complexas de tíbias (LEUNG et al. 2004) e fraturas de alto impacto de ossos longos (LERNER; STEIN; SOUNDY, 2004).

O mecanismo específico pelo qual o ultra-som pulsado de baixa intensidade acelera o reparo ósseo continua assunto de investigação científica. No entanto, em termos de mecanismos físicos, o ultra-som pode exercer uma força mecânica nas células de tecidos moles no local da fratura (TAKIKAWA, 2001). Duarte (1983) sugeriu a investigação do efeito piezoelétrico com o objetivo de esclarecer se este efeito em osso in vivo é apenas devido ao material como transdutor piezoelétrico ou se as células também se comportam como um transdutor em um fenômeno cooperativo.

Investigações demonstraram que o ultra-som de baixa intensidade ativa receptores localizados na membrana celular que são sensíveis a estímulos mecânicos (ZHOU et al., 2004; YANG et al., 2005; POUDER et al., 2008). Eles são encontrados em diversas células que desempenham um papel importante no reparo ósseo. Ao receberem esse estímulo mecânico esses receptores desencadeiam um processo celular em cadeia que resulta na síntese de proteínas e fatores de crescimento (fig, 12)

A al

Fig. 12 - Síntese de proteínas e fatores de crescimento estimulados pelo ultra-som de baixa intensidade
(http://global.smith-nephew.com/us/MECHANISM_OF_ACTION.htm)

Estudo comprovaram que o ultra-som acelera os processos de cicatrização óssea do organismo em todos os estagios de reparo (NARUE et al., 2003; CHENG Y-J et al., 2003; WANG et al., 2004; SANT`ANA et al., 2005).

A estimulação ultra-sônica da regeneração óssea é uma técnica mundialmente disponível para o tratamento não-invasivo de fraturas recentes, com retardo de consolidação ou com não-união sendo citada em revisões de literatura sobre técnicas de tratamento de fraturas (EINHORN, 1995; HANNOUCHE; PETIT; SEDEL, 2001;

LIRANI, 2005). Os seguintes parâmetros de ultra-som são utilizados no tratamento: modo pulsado com intensidade de 30 mW/cm^2 gerado por sinal elétrico aplicado ao transdutor ultra-sônico com frequência de 1,5MHz, largura de pulso de 200us e frequência de repetição de 1KHz.

2.5 Microtomografia Tridimensional para Quantificação do Reparo Ósseo

2.5.1 Introdução

A quantificação do reparo ósseo por μTC de campo paralelo (radiação monocromática sincrotron,) ou campo cônico (radiação policromática) é uma técnica com grande potencialidade para a quantificação do reparo ósseo, mas são poucos os relatos sobre o seu uso na literatura científica. A μTC por radiação sincrotron foi utilizada para avaliar a estrutura 3D do calo da fratura em experimento animal sobre regeneração óssea (AUGAT; RYABY, 2001; KINNEY; NICHOLS, 1992). Augat e Ryaby (2001) descrevem gráficos da frequência de distribuição da densidade mineral óssea em seções transversais do calo ósseo obtidas por microtomografia.

Morgan et al. (2009) afirmam que radiografias são inerentemente uma avaliação bidimensional da estrutura tridimensional de calos. A tomografia computadorizada (CT) proporciona medidas quantitativas e tridimensionais da estrutura e mineralização do calo ósseo, e essas medidas podem estar relacionadas a rigidez e resistência do calo ósseo. A análise quantitativa, baseada em análises de CT da estrutura e composição do calo, pode levar ao desenvolvimento de medidas confiáveis, não-invasivas da regeneração. A caracterização de mudanças temporais na estrutura e mineralização do calo em diferentes condições fisiológicas também serão de grande valor para se relacionar os processos biológicos de regeneração com a resistência mecânica possibilitando entender as relações entre biologia e biomecânica da fratura. A microtomografia oferece resolução superior a tomografia computadorizada na avaliação do reparo ósseo em pequenos animais. Vários estudos tem utilizado a μTC para a caracterização da regeneração em fratura e a formação óssea do alongamento ósseo.

Kerchkhoff et al. (2008) relatam o uso de microtomografia por campo cônico para a determinação do volume ósseo formado no interior e no exterior de implantes utilizados como substitutos ósseos fabricados com metal, cerâmica ou polímero.

Beleville et al. (2008) em um estudo com camundongos monitoraram o reparo do tecido ósseo em fraturas diafisárias de fêmur tratadas com hormônio paratireóide (PTH). Análises tridimensionais do osso fraturado foram realizadas pelo software CT-Analyser fornecido pelo fabricante do microtomógrafo. Com os recursos computacionais disponíveis foi possível separar o calo ósseo do osso pré-existente para medida do volume e superfície óssea do calo formado.

Bakker, Gerrits e Gossn (2008) monitoraram durante 90 dias a taxa de reparo do osso cortical em um defeito produzido na vértebra da cauda de camundongos utilizando microtomografia in vivo.

A tomografia computadorizada (TC) pode fornecer características estruturais e densidade mineral óssea volumétrica (BMD) de um calo. É uma técnica não destrutiva que pode ser usada em modelos pré-clínicos de reparo de fratura e comparada à testes biomecânicos. Assim, mudanças na resistência do calo devido à um tratamento podem potencialmente ser explicada por mudanças na estrutura do calo e BMD. Resultados experimentais em fratura de fêmur de rato comprovaram uma boa correlação entre parâmetros microestruturais e BMD com resistência mecânica (NYMAN et al. 2009).

A sequência de eventos que ocorrem ao longo do processo de mineralização pode ser monitorada por meio da μ TC de forma mais efetiva por produzir imagens tridimensionais, permitindo ainda, por meio de novos algoritmos avaliar índices como resistência óssea, volume ósseo, correlação área/volume ósseo e densidade mineral óssea (FREEMAN, 2009).

2.5.2 Microtomografia

A microtomografia (μ -CT) implica em tomar imagens de projeções de um objeto em diferentes ângulos em volta do mesmo e matematicamente converter esse conjunto de imagens em um conjunto de imagens das suas seções transversais que possibilitam obter a sua visualização 3D. Na figura 13 a fonte de raio-x localizada em S e o detetor de irradiação em O têm uma posição relativa ao objeto escaneado que rotaciona em um

órbita circular em volta de O, o centro do campo de visão. O ponto O é o centro de uma sistema de coordenadas X,Y,Z. Em diferentes ângulos de rotação (θ) as imagens projetadas dos pontos O e P (isto é, O' e P' no detector 2D) tem diferentes posições. A partir dessas mudanças de posições a localização absoluta 3D de O e P são calculadas pelo algoritmo de reconstrução.

Fig. 13 - Figura esquemática do princípio da tomografia (SALMON, 2000)

A figura 14 ilustra os procedimentos microtomográficos ao se escanear as patas traseiras de um rato.

Fig. 14 - Projeções e seções transversais do membro inferior de um rato (SALMON, 2000)

Exemplos de tecnologias de imagem na história da ciência são a microscopia de luz, telescópios, raio x, microscopia eletrônica, ressonância magnética e microscopia de força atômica. O precursor da microtomografia foi a histomorfometria que começou com métodos histológicos para a incrustação e seccionamento de tecido antes da decalcificação (FROST, 1958). O desenvolvimento dos métodos histológicos foram acompanhados pelos progressos na análise microscópica de imagens como as câmeras e análise automática e os microcomputadores. A histomorfometria fornece informações

sobe a estrutura e metabolismo ósseo de amostras de tecido animal e da biópsia de pacientes.

Em paralelo com esses desenvolvimentos, a estereologia, campo da ciência que investiga formulações matemáticas que permitam que medidas feitas em 2D, em um conjunto de seções de um objeto, possam ser convertidas em estimações de parâmetros 3D. Desse modo medidas de perímetro são convertidas em estimativas de área superficial, e medidas de área em estimativas de volume. Essas conversões envolvem uma matemática complexa e apresentam erros significativos (a conjectura de Poincaré sobre a derivação 3D de informações em 2D é um dos mais complexos problemas matemáticos). A maior fonte de erro em derivar parâmetros estruturais 3D a partir de informações 2D é a necessidade de assumir modelos da arquitetura que está sendo estudada. Como exemplo, o modelo de placas assume que o osso trabecular é composto de placas paralelas e o modelo de cilindros assume que este osso é um arranjo de cilindros em paralelo.

A microtomografia trouxe a habilidade de se escanear um objeto de forma não destrutiva e se realizar medidas quantitativas em um modelo 3D (HILDEBRANDT, RUEGSEGGER, 1977a, 1997b; ULRICH et al., 1999). É correto definir a microtomografia como uma extensão da histomorfometria. A μ CT não substitui a histomorfometria pois ela fornece somente informações estruturais e de arquitetura mas não mostra osteoblastos, osteoclastos, osteóides e lacunas de reabsorção na superfície óssea. Assim, ambas as técnicas se complementam.

Após a análise microtomográfica pode se realizar a análise histológica ou submeter o objeto à análises químicas e/ou bioquímica. A microtomografia in-vivo também está disponível (SASOV; DEWAEKE, 2002).

O raio-x é uma irradiação eletromagnética como a luz mas com fótons de alta energia. A radiação por raio-x pode ser utilizada para escanear a estrutura interna de um objeto se parte da radiação é absorvida pelo objeto e parte é transmitida. Se todo o objeto apresentar a mesma absorção de raio-x a sua imagem será representada por uma grade uniforme de cor cinza em um detector de radiação. Consequentemente, uma segunda exigência para escanear um objeto é ele apresentar absorção diferencial nas suas diferentes partes. Uma imagem de projeção é obtida quando o raio-x é transmitido através das diferentes partes ou fases de um objeto. Elas representam as informações necessárias para a reconstrução 3D do objeto. A qualidade da reconstrução 3D depende das imagens de projeção (contraste, relação sinal/ruído, ...). O ajuste dos parâmetros de escaneamento é importante para otimizar a análise por μ CT.

Os três modos mais importantes de interação do raio-x com a matéria são a absorção fotoelétrica, o espalhamento Compton e a produção de pares. A ocorrência dessas interações é determinada pela energia do raio-x e pelo número atômico (Z) do elemento absorvente, como mostra a figura 15.

Fig. 15 - Modos de interação raio-x com a matéria. Os coeficientes σ , τ e κ representam as probabilidades de ocorrência da absorção fotoelétrica, do espalhamento Compton e da produção de pares, respectivamente (SALMON, 2000)

A importante característica da absorção fotoelétrica é que ela predomina para fótons de baixa energia, especialmente quando o número atômico é alto. O fóton incidente de raio-x perde totalmente a sua energia na interação. O espalhamento Compton remove somente parte da energia do fóton e este continua em uma trajetória diferente do campo original ao deixar a fonte de raio-x. Se esses fótons espalhados são detectados pelo detector eles causam artefatos de espalhamento nas imagens. O modo de produção de pares envolve fótons de alta energia sendo convertidos em pares pósitron-elétron nas vizinhanças de um átomo. Os pósitrons tem vida curta produzindo um par de fótons. Ocorrem com fótons de energia acima de 1 Mev.

A implicação prática é que o escaneamento por microtomografia de amostras com maiores números atômicos e com fótons de baixa energia farão com que o modo de absorção fotoelétrica seja predominante resultando em melhores imagens. Para os microtomógrafos de bancada que escaneiam tecido ósseo a absorção fotoelétrica é o modo predominante e, conseqüentemente, o osso é um material ideal para μ CT. O decréscimo da tensão aplicada na fonte de raio-x aumenta as interações por absorção fotoelétrica e aumenta o contraste da imagem mas se a tensão for excessivamente baixa a transmissão é pobre (imagem escura) e o sinal gerado no detector é insuficiente. Amostras ósseas de roedores e biópsias clínicas são melhor escaneadas com tensões no tubo de raio-x no intervalo 40-60 KV, enquanto maiores amostras, como as de grandes mamíferos ou larga parede cortical, requerem 70-100KV.

O coeficiente de absorção fotoelétrica (τ) é muito dependente do número atômico dos elementos presentes na amostra como mostra a equação 1, onde Z é o número atômico, n é um valor entre 4 e 5 e E é a energia do fóton de energia do raio-x.

$$\tau = Constante \frac{Z^n}{E^{3,5}} \quad (1)$$

O fato que Z é elevado à potência entre 4 e 5 significa que a absorção fotoelétrica é muito dependente do número atômico e isto é de fundamental importância para o escaneamento por raio-x e a base da formação de contraste na imagens de μ CT. Isto resulta em um grande contraste entre osso e tecido mole em um animal. O osso é menos que duas vezes mais denso que o tecido mole em termos de peso mas a presença do Ca ($Z=20$) resulta em uma absorção que é muito maior que no tecido mole.

A absorção de raio-x é probabilística, dependendo da probabilidade de raios-x interagirem com os átomos quando se propagam em um objeto. A absorção do raio-x é dada pela equação 2, sendo I e I_0 as intensidades do campo antes e depois da propagação a uma distância x através de sólido com um coeficiente de absorção μ .

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (2)$$

Na preparação de amostras ósseas para análise microtomográfica elas devem ser dissecadas e limpas e mantidas em uma solução tampão de formalina durante um ou mais dias, seguido de um longo armazenamento em etanol 70% se a intenção do estudo é analisar a morfologia trabecular ou cortical. Se medidas de BMD são requeridas as amostras devem ser mantidas em solução salina fisiológica e armazenadas em freezer. É suficiente embrulhá-las em gaze umedecido em solução salina.

2.5.2.1 Análise Morfométrica

A análise morfométrica de ossos trabeculares e corticais inclui os mesmos parâmetros derivados da histomorfometria mas a diferença é a análise direta em 3D. Os parâmetros em comum com a histomorfometria incluem volume ósseo relativo BV/TV, espessura trabecular (Tb.Th) ou cortical (Ct.Th), separação trabecular (Tb.Sp), número trabecular (Tb.N), relação superfície e volume (BS/BV) e fator padrão trabecular (TB.Pf) (HAHN et al. 1992). Alguns parâmetros são exclusivamente medidos em 3D como o índice de modelo estrutural (SMI), índices de conectividade como o TB.PF, o número de Euler (Eu.N) (ODGAARD; GUNDERSEN, 1993) e o grau de anisotropia (DA) (HARRIGAN; MANN, 1984; ODGAARD, 1997).

Há duas etapas necessárias para se realizar a reconstrução das seções microtomográficas para a realização da análise morfométrica que são a binarização e a seleção do volume de interesse (VOI). A figura 16 ilustra a binarização. Os níveis de

cinza produzidos pela reconstrução consistem de voxels que têm 256 níveis de cinza (se as imagens são 8 bits). A imagem binarizada tem 1 bit sendo, por exemplo, o branco representando o sólido, ou o osso, e o preto representando o espaço. O método mais comum de binarização é denominado de “*thresholding* global” que significa estabelecer um único nível de cinza como threshold, tal que todo voxel com igual ou maior valor é representado com uma cor, e valores menores representam o espaço. Técnicas de análise de imagens podem refinar o “*thresholding* global” utilizando a técnica de *despeckle* para remover pontos brancos que aparecem devido a presença de ruído. Um outro método de binarização é denominado “*thresholding* local” que melhora a separação de osso e não-osso em imagens com ruído (WAARSING et al., 2004).

Fig. 16 - *Thresholding* global de seções transversais de amostras ósseas (SALMON, 2000)

2.5.2.2 Calibração da Análise Morfométrica por Micromotografia

A calibração de medidas de espessura é necessária para confirmar que valores medidos estão próximos dos valores reais de espessura. Ela utiliza uma folha de alumínio e é necessária quando se utiliza *thresholding* global ou local. Ainda que o alumínio seja mais denso que o osso (2.6 g.cm^{-3} comparado à $1.3 - 1.8 \text{ g.cm}^{-3}$), o maior número atômico do Ca (20) comparado ao do alumínio (13) compensa a dependência da absorção de raio-x com o número atômico. A opacidade do alumínio é muito próxima do osso e o material é materialmente uniforme. Calibrações com folhas de alumínio com diferentes espessuras ($20\mu\text{m}$ e $250\mu\text{m}$) mostram que a medida de espessura é precisa se

a espessura da estrutura é três ou mais vezes maior que o tamanho do pixel. Estruturas trabeculares com formato cilíndrico necessitam de calibração com fios de alumínio com 5 à 6 pixels de diâmetro para serem medidas.

2.5.2.3 Análise de Densidade Óssea por Microtomografia

Os artefatos que influenciam a medida de densidade óssea são o efeito de volume parcial, o endurecimento de feixe e a espessura do material em volta do objeto de medida. O efeito de volume parcial influencia a medida de densidade dos voxels. A figura 17 ilustra essa influência: quatro folhas de alumínio (250 μ m, 20 μ m, 50 μ m e 125 μ m) foram utilizadas na determinação do perfil de absorção de raio-x. O perfil mostra que valores menores significam maior absorção e maiores densidades, entretanto a densidade das folhas de alumínio é a mesma. As folhas de menor espessura apresentaram menor densidade no perfil.

O endurecimento de feixe resulta da emissão de fontes de raio-x com micro foco que apresenta uma mistura de fótons com baixa e alta energia. Uma fonte ideal deveria ser monocromática, isto é, emitir fótons com uma única energia mas as fontes são policromáticas e quando os raios-x se propagam em um objeto sólido os fótons com baixa energia são removidos do campo. O processo é denominado endurecimento porque duro significa alta energia. A tomografia computadorizada com luz sincrotron e a utilizada na clínica utilizam técnicas especiais de geração de raio-x. Na microtomografia a alta densidade das fontes com micro foco determinam o uso de tungstênio na fonte e este produz uma radiação policromática de raio-x. O efeito de endurecimento de feixe é mostrado na figura 18.

O material em volta do objeto a ser escaneado representa um filtro para o raio-x. Em consequência o mesmo objeto escaneado com pequeno ou nenhum material em volta terá uma densidade maior que quando estiver rodeado por um material mais espesso. A figura 19 mostra as seções transversais de um rato desde a região distal do fêmur (imagem superior) até a região distal da tíbia (imagem inferior). A espessura de tecido mole em direção à tíbia diminui e consequentemente aumenta a densidade óssea.

Fig. 17 - influencia da espessura na medida da densidade (SALMON, 2000)

Fig. 18 - A correção do endurecimento de feixe por software foi realizada na imagem superior resultando em melhor contraste da imagem inferior (SALMON, 2000)

Fig. 19 - Influência da espessura do material em volta de um objeto na qualidade da imagem (SALMON, 2000)

As três fontes de erro na medida da densidade mineral podem ser minimizadas através da calibração usando *phantoms* de materiais com conhecida densidade, como por exemplo, hidroxapatita de cálcio. O phantom ósseo e o material equivalente ao tecido mole em volta do osso (perspex ou água) devem ter a mesma espessura do osso e do tecido mole a ser escaneado.

O interesse de investigar a microestrutura de um objeto resultou no desenvolvimento de algoritmos matemáticos para se determinar a distribuição espacial dos coeficientes de atenuação em cada uma das seções transversais do objeto e reconstruir a imagem das seções transversais conhecendo-se um conjunto de projeções do objeto em várias direções de um feixe de raios X. O algoritmo matemático mais utilizado para a reconstrução das seções, quando o feixe de raios-X é cônico, isto é,

produzido por uma fonte pontual, é o de Feldkamp, citado por Rodet (2004). O feixe cônico é utilizado em microtomógrafos de raios-X disponíveis comercialmente.

A Figura 20 descreve os componentes de um microtomógrafo: a) fonte de raio-x com um foco de dimensão micrométrica e um feixe cônico. Um filtro metálico de alumínio ou cobre de pequena espessura deve ser colocado na frente da fonte para reduzir o efeito denominado de “endurecimento de feixe”; b) mesa com movimento de precisão rotacional (θ) e translacional (direções X, Y e Z) onde é fixado o objeto a ser analisado; c) detector de radiação (câmera CCD).

Fig. 20 - Componentes de um microtomógrafo (MILANETTI, 2010)

A análise de um objeto por μ CT (figura 21) compreende as seguintes etapas (MILANETTI, 2010):

a) Obtenção de projeções do objeto em diferentes posições através de rotações com um incremento angular θ . Uma média de projeções é obtida a cada incremento angular. O incremento angular θ determina o número n de projeções (por exemplo, se $\theta=1^\circ$, $n=360$). A amostra deve ser fixada firmemente à um suporte colocado sobre a mesa de modo a impedir qualquer movimento durante a aquisição das projeções. Utiliza-se uma massa de modelar para fixar o objeto no suporte. O tamanho do pixel do detetor e da magnificação das projeções irá determinar a resolução microtomográfica. As variáveis que influem nesta resolução são a distância da fonte ao objeto (D_1), a distância da fonte ao detetor de radiação (D_2), H_1 a altura do objeto (H_1) e a altura do objeto projetado no detetor de radiação (H_2). O fator de magnificação é $M=(D_1+D_2/D_1)$. Se R é

a resolução microtomográfica e K é a dimensão do pixel do detetor, então a resolução é $R=K/M$.

Fig. 21 - Etapas da microtomografia computadorizada por raios-X (MILANETTI, 2010)

- b) Reconstrução 2D das seções transversais do objeto utilizando o algoritmo de Feldkamp.
- c) Escolha do volume de interesse (VOI) para a análise morfométrica 2D e 3D.
- d) Escolha da região de interesse (ROI) das seções transversais para a análise morfométrica 2D e 3D.
- e) Segmentação das imagens das seções transversais do objeto através do procedimento de binarização para se determinar os pixels que representam o tecido ósseo. Cada pixel da secção transversal possui um valor binário de 8 bits. O seu valor binário é comparado à um valor de referência denominado “threshold”: a) se o valor do

pixel é menor que o do threshold“ o seu valor é convertido em 0 (região da seção transversal que não contém tecido ósseo); b) se o valor do pixel é igual ou maior do que o do threshold“ o seu valor é convertido em 1 (região da seção transversal que contém tecido ósseo).

f) Análise morfométrica 2D e 3D do objeto utilizando-se os softwares fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo.

g) Reconstrução 3D do objeto.

3. OBJETIVO

O objetivo dessa investigação é quantificar e visualizar o reparo ósseo de um defeito ósseo, tratado e não tratado por ultra-som de baixa intensidade, produzido na tíbia de ratos machos da raça Wistar por broca odontológica de alta rotação, utilizando-se microtomografia 3D por raio-X (μ CT) por campo cônico.

4. MATERIAL E MÉTODO

Nessa investigação foram utilizados 40 ratos machos da raça Whistar com peso aproximado de 280g fornecidos pelo Biotério Central da UNESP de Araraquara. Um defeito ósseo cirúrgico no terço proximal da tíbia direita dos animais foi produzido por uma broca odontológica com alta rotação. Todos os procedimentos cirúrgicos foram feitos seguindo os princípios éticos da experimentação animal (COBEA, 1991) e as normas para a prática didático-científica da dissecação de animais (lei 6638/08 de maio de 1979) sob anestesia geral e com condições de assepsia padrão.

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais caracterizados pela utilização ou não utilização do tratamento do defeito por ultra-som pulsado de baixa intensidade (LJPUS, 30 mW/cm²) e pela duração do experimento (Tabela 2). No grupo 1 o tratamento por ultra-som teve a duração de 14 dias, 5 sessões de tratamento por semana. No grupo 2 não houve tratamento por ultra-som e a duração foi de 14 dias. No grupo 3 o tratamento por ultra-som teve a duração de 21 dias, 5 sessões de tratamento por semana. No grupo 4 não houve tratamento por ultra-som e a duração foi de 21 dias. Nos grupos 1 a 4 foram utilizados 10 animais para a avaliação por μ CT. O defeito ósseo da tíbia direita nos animais dos grupos 1 e 3 foram tratados com ultra-som de baixa intensidade utilizando-se o “*estimulador ultra-sônico de regeneração óssea*” construído no laboratório de eletrônica do Programa de Pós-graduação Bioengenharia da USP São Carlos. A avaliação por μ CT foi realizada através dos softwares NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer e CT-Vol fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo (SkyScan, Bélgica).

Tabela 2 - Grupos Experimentais

Grupo Experimental	Tratamento por LJPUS (14 dias)	Não tratamento por LJPUS (14 dias)	Tratamento por LJPUS (21 dias)	Não tratamento por LJPUS (21 dias)
1	x	-	-	-
2	-	x	-	-
3	-	-	x	-
4	-	-	-	x

4.1 Cirurgia dos Animais

Aos animais foi administrado uma mistura de 0,1ml do anestésico cloridrato de cetamina (Ketamina ou Ketamin) e 0,1ml do relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompun) para cada 100g de massa corporal. O local da cirurgia foi submetido à tricotomia pré-operatória (Fig. 21) e higienização com solução iodada. Com o auxílio de um bisturi (Fig. 22) o terço médio da tíbia direita, logo abaixo do joelho, foi exposto sem que causasse lesões nos músculos e periósteo (Fig. 23), sendo estes afastados com os instrumentos cirúrgicos e reaproximados após o procedimento da osteotomia.

Para a realização dos defeitos ósseos foi utilizado um aparelho da marca Driller K (modelo BLM600 plus), com caneta de alta rotação e fresa de 1 mm de diâmetro, 690 rpm e uso de irrigação com soro fisiológico para não causar queimaduras nos tecidos.

Fig. 22 - Tricotomia pré-operatória

Fig. 23 - Separação dos músculos com auxílio do bisturi

Fig. 24 - Exposição do terço médio da tíbia

Uma fissura transversal no platô da tíbia na direção medial de aproximadamente 5 mm de comprimento e 1mm de profundidade foi realizada a aproximadamente 8 mm da região distal do joelho.

O modelo de defeito ósseo foi descrito por Lirani (2005) em estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de ratos. O uso da broca odontológica acoplada a um motor de alta rotação para a produção do defeito na tíbia direita é mostrado na fig.24. Na fig.25 observa-se o defeito ósseo produzido na tíbia. A sutura da incisão na pele será realizada com fio de seda.

Fig. 25 - Uso da broca odontológica para a produção do defeito ósseo

Fig. 26 - Fissura transversal no platô da tíbia

4.2 Tratamento por Ultra-som

O defeito ósseo na tíbia direita dos animais dos grupos 1 e 3 foi tratado com ultra-som de baixa intensidade (30 mW/cm^2 , 1,5MHz de frequência fundamental, 1KHz de frequência de repetição e 200us de largura de pulso) em 10 sessões e 15 sessões respectivamente de 20 minutos a partir do terceiro dia pós-cirúrgico, 5 vezes por semana. No equipamento “*estimulador ultra-sônico de regeneração óssea*” (Fig. 26) foram realizadas dosimetrias regulares nos laboratórios do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – USP em São Carlos utilizando-se uma balança de radiação acústica Ultrasound Power Meter UPM-DT-1 da Ohmic Instruments (EUA), figura 27.

Fig. 27 - Estimulador Ultra-Sônico da Regeneração Óssea

Fig. 28 - Dosímetro de ultra-som utilizando o princípio de balança de radiação acústica

Durante o tratamento por ultra-som os animais foram imobilizados por um dispositivo mostrado na figura 28 que apresenta furos para a respiração do animal. O seu uso evita o uso de anestésico durante o tratamento. Os animais dos grupos 2 e 4 (controles) foram submetidos às mesmas cirurgias mas não receberam qualquer tratamento, sendo mantidos no Biotério por 14 e 21 dias respectivamente.

Os animais do grupo 1 e 3 após receberem o tratamento, e os animais do grupo 2 e 4 após completarem os dias para controle, foram sacrificados por overdose de Ketamin e Ronpun (0,7 ml de cada). As tíbias direita foram retiradas e mantidas em congelador doméstico até serem utilizados para a avaliação do reparo ósseo.

Fig.29 - Dispositivo de imobilização animal para o tratamento por ultra-som

4.3 Quantificação do Reparo Ósseo por Microtomografia 3D

A avaliação do reparo do defeito ósseo nas tíbias por uCT foi realizada na Embrapa Instrumentação Agropecuária (São Carlos – SP) utilizando-se o microtomógrafo modelo 1172 (Skyscan, Bélgica) e os softwares NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer e CT-Vol fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo. Uma imagem do microtomógrafo, modelo 1172 (SkyScan, Bélgica), é mostrada na Figura 29. A avaliação compreendeu as seguintes etapas (MILANETTI, 2010):

Fig. 30 - Microtomógrafo por raio-X de alta resolução (SkyScan 1172, Bélgica)

Etapas 1: Calibração da medida da densidade mineral óssea em phantoms

Phantoms cuja composição química mineral é a mesma do tecido ósseo foram escaneados por microtomografia. Esses phantoms são comercialmente disponíveis, foram importados do fabricante do microtomógrafo, possuem geometria cilíndrica (Figura 30) e as seguintes características:

Propriedades Químicas e Físicas:

- Concentração: 0,25 g/cm³ ou 0,75 g/cm³

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂: 97 – 98%

Ca₂(P₂O₇): 2%

Ca₃(PO₄)₂ : 1%

- Peso molecular: 1,004

- Solubilidade: insolúvel em água, meio neutro ou alcalino. Solúvel em meio com pH <5.5

Geometria: cilindros com diâmetro de 2 ou 4 mm.

Fig. 31 - Phantoms de hidroxiapatita com diâmetro de 4 mm e concentração de 0.25g/cm³ (A) e 0.75g/cm³ (B)

Os seguintes procedimentos foram utilizados na calibração (MILANETTI, 2010):

- a) Escaneamento microtomográfico dos phantons com os seguintes parâmetros: fonte de raio-X operando com 89KV e 112uA, filtro de alumínio de 0,5mm de espessura, rotação de 180° com incremento angular de 0,4°, aquisição com câmara CCD de 10Mp de 8 projeções radiográficas em cada rotação e resolução de 4,43 μ m.
- b) Reconstrução microtomográfica dos phantons pelo software NRecon utilizando-se o algoritmo de Feldkamp (1984).
- c) Visualização da reconstrução microtomográfica 2D do phantom. A Figura 31 mostra a reconstrução do phantom com 0.75g/cm³ de hidroxiapatita utilizando-se o software CT-Analyzer. Na janela superior à esquerda observa-se a imagem de uma das projeções do phantom obtida durante o processo de escaneamento. A linha horizontal vermelha indica a secção transversal do phantom que está sendo mostrada na janela inferior. A janela superior à direita lista os arquivos imagens das reconstruções 2D das secções transversais do phantom.

Fig. 32 - Projecção e secção transversal do phantom com concentração de $0,75 \text{ g/cm}^3$ de hidroxiapatita

d) Determinação do volume de interesse (VOI) do phantom para o cálculo do coeficiente médio de atenuação linear. A linha vermelha delimita a secção transversal inferior (Figura 32) e superior (Figura 33) da VOI. Foram seleccionadas 100 secções transversais.

Fig. 33 - Determinação da secção transversal inferior da VOI (linha vermelha) do phantom com concentração $0,75 \text{ g/cm}^3$

Fig. 34 - Determinação da secção transversal superior da VOI (linha vermelha) do phantom com concentração $0,75 \text{ g/cm}^3$

e) Determinação da região de interesse (ROI) de cada secção transversal da VOI do phantom. Na figura 34 o círculo vermelho com diâmetro ligeiramente inferior ao do phantom foi superposto à secção transversal. A superposição das duas imagens aparece na Figura 35 sendo a ROI a região compreendida pelo círculo de menor diâmetro.

Fig. 35 - Escolha da região de interesse (ROI) na secção transversal do phantom com concentração $0,75 \text{ g/cm}^3$

Fig. 36 - Superposição da região de interesse (ROI) na secção transversal do phantom com concentração $0,75 \text{ g/cm}^3$

f) Binarização das imagens da VOI utilizando-se um *threshold* (Fig. 36) dos tons de cinza para determinação do valor médio dos coeficientes de atenuação dos voxels da VOI. Para o phantom de maior concentração este valor é 0.02253 cm^{-1} .

Fig. 37 - Binarização dos tons de cinza para cálculo do valor médio do coeficiente de atenuação

g) Os procedimentos anteriores foram repetidos para o phantom de menor concentração. O valor médio do coeficiente de atenuação medido para este phantom foi

0.01070 cm^{-1} . A relação linear entre BMD e o coeficiente de atenuação resulta na equação de conversão de valores de coeficiente de atenuação para BMD (Equação 3) que é determinada utilizando-se as concentrações de hidroxiapatita ($0,25$ e $0,75 \text{ g/cm}^3$) e os respectivos valores médios dos coeficientes de atenuação (0.01070 e 0.02253 cm^{-1}) dos phantoms.

$$\text{BMD} = \frac{\text{Coeficiente de Atenuação} - 0.004785}{0.02366} \quad (\text{g/cm}^3) \quad (3)$$

A BMD de um calo ósseo é determinada através da equação 3 desde que se conheça o seu coeficiente médio de atenuação que é medido utilizando-se as reconstruções microtomográficas das tíbias direitas, conforme descrito na etapa 2.

Etapa 2: Utilização da reconstrução microtomográfica 2D da tíbia direita para a segmentação do calo ósseo formado no reparo do defeito e medida dos parâmetros volume total (TV), volume de osso mineralizado (BV) e densidade mineral (BMD) do calo ósseo.

Os seguintes procedimentos foram utilizados para a segmentação do calo ósseo e medida dos parâmetros acima descritos:

A avaliação do reparo do defeito ósseo nas tíbias por uCT foi realizada na Embrapa Instrumentação Agropecuária (São Carlos – SP) utilizando-se o microtomógrafo modelo 1172 (Skyscan, Bélgica) e os softwares NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer e CT-Vol fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo, compreendendo as seguintes etapas:

- a) Escaneamento microtomográfico das tíbias excisadas com os seguintes parâmetros: fonte de raio-X operando com 89KV e 112uA, filtro de alumínio de 0,5mm de espessura, rotação de 180° com incremento angular de $0,4^\circ$, aquisição com câmara CCD de 10Mp, 8 projeções radiográficas em cada rotação e resolução de 4,43um.
- b) Reconstrução microtomográfica das tíbias pelo software NRecon utilizando-se o algoritmo de Feldkamp (1984).

c) Visualização coronal, transversal e sagital de reconstruções microtomográficas das tíbias através do software Dataviewer.

d) Seleção de uma VOI nas tíbias contendo o calo ósseo utilizando-se o software CT-Analyzer. Foram selecionadas as secções transversais contendo o defeito ósseo (região entre as áreas verdes da figuras 37 à 39) adotando-se o critério de escolha de uma a cada quatro secções transversais contidas nesta região. Este critério de escolha teve o objetivo de acelerar todos os procedimentos computacionais realizados pelos softwares CT-Analyzer e Dataviewer pois utilizaram um número menor de secções. A figura 40 mostra a secção central da VOI acima descrita contendo o tecido de reparo do defeito ósseo no 14^o dia pós-cirúrgico.

Fig. 38 - Escolha da secção transversal proximal da VOI para uma amostra de 14 dias do grupo controle

Fig 39 - Escolha da seção transversal media da VOI para uma amostra de 14 dias do grupo controle

Fig 40 - Escolha da seção transversal distal da VOI para uma amostra de 14 dias do grupo controle

Fig. 41 - Secção transversal contendo o tecido de reparo do defeito ósseo no 14o dia pós-cirúrgico

e) Escolha de uma ROI com formato irregular em cada secção transversal da VOI contendo o tecido ósseo neoformado. A Figura 41 exemplifica a ROI da secção transversal mostrada na figura 40. O software gera automaticamente uma ROI com as mesmas características da seção descrita em todas as seções da VOI.

Fig. 42 - ROI de uma secção transversal da VOI onde há presença do calo ósseo

f) Separação e visualização 2D do tecido de reparo ósseo nas reconstruções microtomográficas de cada tíbia através do software CT-Analyzer, utilizando um algoritmo de processamento de imagem com os seguintes procedimentos: a) thresholding para binarização das reconstruções microtomográficas; b) delimitação da região de interesse contendo o tecido de reparo e o tecido adjacente; c) separação do tecido de reparo do tecido adjacente com operações morfológicas de abertura e fechamento; d) segmentação do tecido de reparo na região de interesse. Os procedimentos de binarização e segmentação são mostrados nas figuras 42 à 44.

Fig. 43 - Binarização de uma das seções transversais da VOI

Fig. 44 - Imagem de uma seção transversal da VOI antes da segmentação

(a)

(b)

(c)

(d)

Fig. 45 - Imagem do tecido neoformado (a,d) na seção transversal da VOI (b,c) mostrada na figura 43 depois da segmentação

- g) Medida dos parâmetros TV e BV do calo ósseo utilizando-se o plug-in *3D Analysis* do software CT-Analyzer.
- h) Medida da BMD do calo ósseo utilizando-se o plug-in *Histogram* do software CT-Analyzer. Esse plug-in calcula o valor médio do coeficiente de atenuação do calo ósseo e utiliza a Equação 3 para o cálculo da BMD.
- i) Visualização 3D do calo ósseo das tíbias através do software CT-Vol.

4.4. Análise Estatística

A reparação óssea do defeito na tíbia tratado por ultra-som de baixa intensidade foi comparada com a da tíbia não tratado por ultra-som de baixa intensidade por meio de análise estatística dos parâmetros volume do calo mineralizado/volume total do calo ósseo (BV/TV) e densidade mineral óssea do calo (BMD) pelo método t-student para observações independentes (2 grupos), com o seguinte procedimento:

a) Escolha do nível de significância desejado (probabilidade para hipótese nula), $(\alpha) = 0,05$

b) Cálculo da média de cada grupo experimental pela equação (4):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (4)$$

c) Cálculo da variância de cada grupo experimental pela equação (5):

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (5)$$

d) Cálculo da variância ponderada pela equação (6) sendo n_1 é o número de elementos do grupo 1 e n_2 o número de elementos do grupo 2:

$$s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2} \quad (6)$$

e) Valor de t pela equação (7):

$$t = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (7)$$

O valor calculado de t foi 0,5657323. Para $\alpha = 0,05$, 12 graus de liberdade e $N=7$ o valor tabelado de $t_{\text{tab}} = 2,18$ e $p = 0,291$. Se $t \geq t_{\text{tab}}$ as médias das amostras não são iguais e existe diferença entre as amostras e se $t < t_{\text{tab}}$ as médias das amostras são iguais.

5. RESULTADOS

5.1 Visualização 2D do Reparo Ósseo

O software Dataviewer foi utilizado para a visualização das reconstruções microtomográficas das tíbias direita dos ratos através dos planos transversal (A), sagital (B) e coronal (C).

As figuras 45 à 48 mostram as reconstruções microtomográficas do reparo ósseo de animais de cada grupo experimental. Observa-se o reparo do defeito ósseo nos grupos 1 e 2 e nos grupos 3 e 4 a completa cicatrização óssea e a ausência de calo.

Fig. 46 - Reparo ósseo da tíbia de animal do grupo experimental 1 (14 dias em tratamento), vista transversal (A), sagital (B) e coronal (C)

Fig. 47 - Reparo ósseo da tíbia de animal do grupo experimental 2 (14 dias sem tratamento), vista transversal (A), sagital (B) e coronal (C)

Fig. 48 - Reparo ósseo da tíbia de animal do grupo experimental 3 (21 dias em tratamento), vista transversal (A), sagital (B) e coronal (C)

Fig. 49 - Reparo ósseo da tíbia de animal do grupo experimental 3 (21 dias sem tratamento), vista transversal (A), sagital (B) e coronal (C)

5.2 Visualização 3D do Reparo Ósseo

As figuras 49 e 50 exemplificam a visualização 3D do calo ósseo em uma tíbia do grupo experimental 1 (com tratamento – 14 dias) e 2 (sem tratamento – 14 dias), respectivamente.

Fig. 50 - Visualização 3D de um calo ósseo de tíbia tratada por ultra-som durante 14 dias

Fig. 51 - Visualização 3D de um calo ósseo de tíbia não tratada por ultra-som durante 14 dias

5.3 Quantificação do calo ósseo

Através do software CTanalyser foram obtidos os valores dos seguintes parâmetros:

- Volume total (TV)
- Volume do calo mineralizado (BV)
- Relação entre volume do calo mineralizado e volume total (BV/TV)
- Densidade mineral óssea (BMD)

Os resultados estão descritos nas tabelas 3 e 4. As figuras 51 à 56 mostram os valores de TV, BV, BMD e os resultados da relação BV/TV dos grupos 1 e 2.

Tabela 3 - Parâmetros morfométricos do tecido neoformado no grupo experimental com tratamento por ultra-som de 14 dias (grupo 1)

Amostras	TV (mm ³)	BV (mm ³)	BV/TV (%)	BMD(g/cm ³)
1	2,79	1,30	46,58	0,22
2	2,16	0,95	44,01	0,22
3	3,80	2,01	53,04	0,29
4	1,62	0,92	56,99	0,25
5	2,29	1,28	55,83	0,27
6	2,19	1,17	53,58	0,27
7	3,20	1,83	57,37	0,27
8	Fratura consolidada			
9	Fratura consolidada			
Média	2,58	1,35	52,49	0,26

TV= volume do calo ósseo, BV= volume do calo ósseo mineralizado, BV/TV= volume do calo mineralizado/volume total do calo ósseo, BMD= densidade mineral óssea do calo ósseo, mm³= milímetros cúbicos, %= por cento, g/cm³= gramas por centímetro cúbico

Tabela 4 - Parâmetros morfométricos do tecido neoformado no grupo experimental sem tratamento por ultra-som durante 14 dias (grupo 2)

Amostras	TV (mm ³)	BV (mm ³)	BV/TV (%)	BMD(g/cm ³)
1	2,29	1,29	56,62	0,31
2	2,24	1,20	53,45	0,29
3	1,18	0,59	50,52	0,28
4	1,31	0,71	54,13	0,29
5	1,80	0,78	43,36	0,27
6	1,45	0,70	48,64	0,24
7	2,11	1,00	47,73	0,28
8	Fratura consolidada			
9	Fratura não consolidada			
Média	1,77	0,9	50,64	0,28

Fig. 52 - Percentual de volume ósseo mineralizado no calo das amostras do grupo experimental 1

Fig.53 - Percentual de volume ósseo mineralizado no calo das amostras do grupo experimental 2

Fig.54 - Densidade mineral volumétrica do calo das amostras do grupo experimental 1

Fig. 55 - Densidade mineral volumétrica do calo das amostras do grupo experimental 2

Fig. 56 - Valor médio da relação BV/TV dos grupos experimentais 1 e 2

Fig. 57 - Valor médio da densidade mineral óssea volumétrica dos grupos experimentais 1 e 2

6. DISCUSSÃO

O uso da tecnologia de microtomografia nessa investigação foi muito gratificante. Os softwares NRecon, CTanalyser, CTvol e Dataviewer fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo (SkyScan, Bélgica) demonstraram ser muito eficientes para o propósito a que foram desenvolvidos. O NRecon, instalado nos computadores da EMBRAPA – Instrumentação Agropecuária (São Carlos – SP), utilizou o algoritmo de Felkdcamp para obtenção das reconstruções microtomográficas. O Dataviewer permitiu visualizar com rapidez as imagens das seções transversais, sagitais e coronais das amostras ósseas contendo o defeito ósseo produzido nas tíbias dos animais. O software permite também a geração de VOI em qualquer uma dessas orientações anatômicas. O CTanalyser realiza com rapidez a visualização das imagens transversais e a análise morfométrica de diversos parâmetros microestruturais ainda que nessa investigação foram quantificados apenas os parâmetros BV, TV, BV/TV e BMD. Este software disponibiliza vários *plug-ins* de processamento de imagens (*thresholding, despeckle, ROI shrink wrap, morphological operations, bitwise operations, 3D model, histograms, save bitmaps*) sendo que a maioria deles foi utilizada nessa investigação ao ser desenvolver o algoritmo de processamento das imagens com a colaboração do cientista de aplicações da SkyScan, Dr. Phil Salmon. O CTvol apresenta vários recursos, incluindo a geração de arquivos de vídeos, para a visualização 3D das amostras em análise. As potencialidades dessa técnica de caracterização de materiais são enormes e a utilização dos recursos desses softwares deve ser incentivada, sugerindo que novas investigações façam o uso da mesma com a intenção de formar profissionais com essa habilidade para a caracterização de materiais biológicos e de engenharia. A possibilidade de visualização microestrutural através do μ CT é extremamente útil como ferramenta de investigação na área de saúde e bioengenharia (tecnologias medicamentosas, invasivas ou não invasivas de reparo ósseo, implantes odontológicos, ...).

A tecnologia do μ CT nasceu nos anos 80 como ferramenta extremamente necessária para as investigações sobre caracterização da qualidade óssea e está sendo mundialmente utilizada, particularmente pelos laboratórios líderes nessa área de investigação com sede nos EUA e na Europa. A disponibilidade desse equipamento em São Carlos é motivo de grande satisfação para os pesquisadores interessados na caracterização microestrutural de materiais biológicos ou compósitos utilizados em engenharia.

As imagens das seções transversais do reparo ósseo na tíbia dos animais dos subgrupos experimentais 1 à 4 utilizando os softwares Dataviewer ou CTAnalyser, mostram a presença do calo ósseo nos grupos experimentais 1 e 2 e a consolidação do reparo ósseo nos grupos experimentais 3 e 4. A consolidação óssea nestes grupos inviabilizou a quantificação morfométrica dos parâmetros BV, TV, BV/TV e BMD. A existência do calo ósseo nos grupos 1 e 2 permitiu o uso do software CTAnalyser para a quantificação morfométrica dos mesmos parâmetros e a visualização 2D e 3D do calo através do software CTvol. Na quantificação do calo foram analisadas as amostras 1 à 7 dos subgrupos experimentais 1 e 2, pois tanto as amostras 8 e 9 do subgrupo 1, e a amostra 8 do sub grupo 2 apresentaram uma cicatrização completa. A amostra 9 do subgrupo 2 não apresentou reparo ósseo. Os valores médios dos parâmetros TV, BV, BV/TV foram maiores nas tíbias tratadas por ultra-som durante 14 dias. A média da BMD foi ligeiramente maior nas tíbias não tratadas por ultra-som durante dias. Não houve diferença estatística na comparação desses parâmetros entre esses grupos experimentais.

Os resultados de experimentos animais e clínicos da tecnologia de tratamento de fratura por ultra-som de baixa intensidade, nacionais e estrangeiros, relatados na revisão de literatura, demonstram a eficiência dessa técnica não-invasiva de tratamento de fratura mundialmente disponível na clínica ortopédica e muito promissora para aplicações em odontologia, reparo de tecidos moles e traumatologia ortopédica veterinária. A metodologia utilizada na produção do defeito ósseo pode não ter sido adequada sugerindo que em futuras investigações seja substituída pela descrita por Bonnarens e Einhorn (1984) que utiliza uma guilhotina para a produção de fraturas transversas em fêmur e estabilização do foco de fratura com fio de Kirchner. A técnica tem grande reprodutibilidade e o calo ósseo é exuberante (MORGAN et al., 2009) . O baixo número amostral não parece ter tido influência nos resultados da análise estatística, ainda que futuras investigações devam utilizar um número maior de animais.

As amostras do subgrupo 4 (21 dias sem tratamento por ultra-som) tiveram uma consolidação completa aos 21 dias. Einhorn (2005) relata um período de 28 à 35 dias para a existência de cartilagem e tecido ósseo neoformado utilizando-se em ratos o modelo de fratura com guilhotina e fio de Kirchner.

A escolha da ROI nessa investigação foi diferente da utilizada por Milanetti (2010) que foi a primeira a utilizar o algoritmo aqui descrito de separação do osso neoformado do tecido adjacente. A ROI utilizada nessa investigação demonstrou ser mais eficiente que a anteriormente descrita em publicação da mesma autora (MILLANETTI, 2010b) pois uma maior área do tecido cortical pré-existente nas seções transversais foi eliminada do processamento computacional.

Uma técnica de validação da metodologia de avaliação do reparo ósseo descrita nesta investigação precisa ser desenvolvida. A literatura mais recente sobre o uso de μ CT para a caracterização de reparo não descreve essa técnica (BAKKER et al., 2008; BELLEVILLE et al., 2008; FREEMAN et al., 2009; MORGAN et al., 2009).

Na segmentação do tecido de reparo ósseo relativa ao subgrupo 1 observou-se uma pequena perda de pixels possivelmente causada pelo procedimento de *thresholding*. Esse procedimento é dependente de uma análise visual pelo usuário do software CT-Analyzer para comparar as reconstruções microtomográficas e o resultado da binarização ao decidir sobre o intervalo de níveis de cinza que serão utilizados no procedimento. O algoritmo de processamento de imagem utilizado nessa investigação envolve procedimentos de *thresholding*, delimitação da região de interesse e segmentação do tecido de reparo do tecido adjacente que antecede a implementação da análise morfométrica ou quantificação 3D do tecido de reparo. A análise é realizada pelo mesmo software após a binarização das imagens segmentadas para a quantificação de parâmetros como o volume e a densidade mineral volumétrica (análise morfométrica). Essa implementação é inerente ao processo em andamento no PPGIB-USP de formação de pesquisadores brasileiros no uso da técnica de microtomografia e de softwares à ela associados para a caracterização do reparo ósseo em fraturas experimentais. A otimização do algoritmo para a melhoria da segmentação do tecido neoformado deverá ser objetivo de outra investigação.

7. CONCLUSÃO

A técnica de micrtotomografia por raio X tem um enorme potencial a ser utilizado na caracterização de reparo ósseo utilizando-se técnica invasiva ou não-invasivas de tratamento em modelos animais.

Não foi observado diferenças estatísticas significantes nos parâmetros volume de tecido ósseo (TV), volume de reparo de tecido (BV), relação volume de tecido de reparo e volume de tecido ósseo (BV/TV) e densidade mineral óssea (BMD) medidos por análise morfométrica, utilizando-se microtomografia tri-dimensional por raio X no reparo de defeito ósseo produzido em tíbias de rato por broca odontológica tratadas ou não tratadas por ultra-som de baixa intensidade durante 14 ou 21 dias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUGAT, P.; RYABY, J.T. (2001). Fracture healing and micro-architecture. In: MAJUNDAR, S.; BAY, B.K. (Ed.). **Noninvasive assessment of trabecular bone architecture and the competence of bone**. New York: Kluwer Academic; Plenum. p.99-108

BAKKER, N.; GERRITS, H.; GOSSN, J. (2008). **Validation of new potential drugs targets for osteoporosis and fracture repair by in vivo uCT**. Belgium: **Proceedings...**

BELLEVILLE, C. et al. (2008). High resolution tomodensitometry of bone fracture healing in mouse. In: SKYSCAN USER MEETINGS, 15-17 junho 2008, Belgium.

CALIXTO, S.P. (2007). **Estudo do efeito de campo elétrico pulsado no reparo ósseo em tibia de ratos**. 73p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

CHANG, W.H. et al. (2002). Study of thermal effects of ultrasound stimulation on fracture healing. **Bioelectromagnetics**, New York, v.23, n.4, p.256-263, May.

CHEN, N.X. et al. (2000). Ca^{+2} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. **American Journal Physiology - Cell Physiology**, Bethesda, v.278, n.5, p.C989-997, May.

CHEN, Y-J., WANG, C-J., YANG, K.D. (2003). Pertussis toxin-sensitive Gai protein and ERK dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. **FEBS Letter**, v. 554, p. 154-158.

DANGELO, J.G.; FATTINI, C.A. (2003). **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. 2.ed. São Paulo: Atheneu. p. 12 – 18.

DINIZ, J.S. et al. (2005). Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9./ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 5., 2005, São José dos Campos. **Anais...** São José dos campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2005. p. 1364-8

DUARTE, L.R. (1977). **Estimulação ultra-sônica do calo ósseo**. 109p. Tese (Livredocência) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1977.

DUARTE, L.R. (1983). The Stimulation of bone growth by ultrasound. **Archives of Orthopaedical and Trauma Surgery**, Berlin, v.101, n.3, p.153-159, Apr.

DUARTE, L.R.; XAVIER, C.A.M. (1983). Estimulação ultra-sônica do calo ósseo: aplicação clínica. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Belo Horizonte, v.18, n.3, p.73-80.

DUNCAN, R.L.; HRUSKA, K.A. (1994). Chronic, intermittent loading alters mechanosensitive channel characteristics in osteoblast-like cells. **American Journal Physiology**, Baltimore, v.267, n.6, p.F909-916.

EINHORN, T.A. (2005). The Science of Fracture Healing. *Journal Orthop Trauma* v. 19, n. 10, p. 4-6 November/December 2005

EINHORN, T.A. (1996). Enhancement of fracture healing – current concepts review. *Journal of Bone and Joint Surgery (Am)*, Boston, v.77, n.6, p.940-956, June.

FREEMAN, T.A. et al. (2009). Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.27, n.5, p.673-679, May.

FRIEDLAENDER, G.E.; LIEBERMAN, J.R. (2005). **Bone regeneration and repair**. New Jersey: Human Press. Pág.2

FROST, H.M. (1958), Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manual method, **Stain Technology**, v. 33 (6), p. 273-277.

FUKADA, E.; YASUDA, I. (1957). On The Piezoelectric effect of bone. **Journal of the Physical of Society Japan**, Tokyo, v.12, n.10, p.1158-1162, Oct.

GEBAUER, G.P. et al. (2002). Low-intensity pulsed ultrasound increases the fracture callus strength in diabetic BB Whistar rats but does not affect cellular proliferation. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.20, n.3, p.587-592, May.

HANNOUCHE, D.; PETITE, H.; SEDEL, L. (2001). Current trends in the enhancement of fracture healing. **Journal of Bone and Joint Surgery (Br)**, London, v.83, n.2, p.157-164.

HECKMAN, J.D.; SARASOHN-KAHN, J. (1997). The Economics of treating tibia fractures: the cost of delayed unions. **Bulletin of the Hospital for Joint Diseases**, New York, v.56, p.63-72.

HECKMAN, J.D. et al. (1994). Acceleration of tibial fracture healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. **Journal of Bone Joint Surgery**, Boston, v.76, n.1, p.26-34, Jan.

HILDEBRAND, T., RUEGSEGG, P. (1997a) A new method for the model independent ension assessment of thickness in three dimal images. **Journal of Microscopy**, v. 185, p. 67-75.

HILDEBRAND, T, RUEGSEGG, P. (1997b). Quantification of bone microarchitecture with the structure model index. **Comp. Meth. Biomech. Biomed. Eng**, v. 1, p. 15-23.

JORGE, A.E.S. (2009). **Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa crônica**: estudo comparativo de duas técnicas de aplicação. 99p.

Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1990). **Histologia básica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara. p.113-147.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (2008). **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara.

HAHN, M, VOGEL, M., POMPESIUS KEMPA, M., DELLING, G. (1992). Trabecular bone pattern factor – a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* V.13, p. 327-330.

HARRIGAN T P AND MANN R W (1984) Characterisation of microstructural anisotropy in orthotropic materials using a second rank tensor. *Journal of Material. Science*, v.19, p. 761-767.

KERCHKHOFF, G. et al . (2008). Validation of uCT as na imaging tool for the quantification of bone formation in and around explanted bone tissue engineering scaffolds. In: SKYSCAN USER MEETINGS, Antwerp,15-17 de junho de 2008, Belgium. **Proceedings...**

KERR, J.B. (2000). **Atlas de histologia funcional**. São Paulo: Artes Médicas. pág. 163-167.

KRISTIANSEN, T.K.et al. (1997). Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound: a multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal Bone and Joint Surgery (Am)**, Boston, v.79, n.7, p.961-973, July.

KINNEY, J.H.; NICHOLS, N.C. (1992). X-ray tomographic microscopy using synchrotron radiation. **Annual Review of Materials Science**, Palo Alto, v.22, p.121-152.

LERNER, A.; STEIN, H.; SOUNDRY, M. (2004). Compound high-energy limb fractures with delayed union: our experience with adjuvant ultrasound stimulation (exogen). **Ultrasonics**, Amsterdam, v.42, n.1/9, p.915-917, Apr.

LEUNG, K.S.et al. (2004). Complex tibial fracture outcomes following treatment with low-intensity pulsed ultrasound. **Ultrasound in Medicine & Biology**, Amsterdam, v.30, n.3, p.389-395, Mar.

LIRANI, A.P.R. (2004). **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tíbia de rato**. 94p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

LIRANI, A.P.R.; CASTRO, M.L. (2005). Evidências da ação de agentes físicos sobre o metabolismo do tecido ósseo e seus potenciais usos clínicos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo*, São Paulo, v.49, n.6, p.891-896, dez.

MILANETTI, M.R. (2010). Quantificação do volume e densidade mineral do calo ósseo em fraturas experimentais por microtomografia 3D por raio-x. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

MORGAN, E.F. (2009). Micro-computed tomography assessment of fracture healing: relationships among callus structure, composition, and mechanical function. **Bone**, Amsterdam, v.44, n.n.2, p.335-344, Feb.

MOTA, N.L. et al (2008). Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v 27, Juiz de Fora, n. 1/2, p. 27-32, 2008.

NARUSE, K., MIYAUCHI, A., ITOMAN, M., MIKUNI-TAKAGAKI, Y. (2003). Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *Journal of Bone and Mineral Research*. v.18:2, p .360-369.

NYMAN, J.S. et al. (2009). Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography. **Journal of Biomechanics**, New York, v.42, n.7, p.891-897, May.

ODGAARD, A., GUNDERSEN, H.J. (1993) Quantification of connectivity in cancellous bone with special emphasis on 3D reconstructions. **Bone**, v.14 (2), p. 173-182.

ODGAARD A (1997) Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture, **Bone**, v. 20 (6). p. 315-328.

POUNDER, N.M., HARRISON, A.J (2008). Low intensity pulsed ultrasound for fracture healing: a review of the clinical evidence and the associated biological mechanism of action. **Ultrasonics**, v.48(4), p.330-338.

RODET, T.; NOO, F.; DEFRISE, M. (2004). The cone-beam algorithm of Feldkamp, Davis, and Kress preserves oblique line integrals, *American Association of Physicists in Medicine*, July.

RUBIN, C., BOLANDER, M., RYABY, J.P., HADJIARGVROU, M. (2001). The Use of Low-Intensity Ultrasound to Accelerate the Healing of Fractures, **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.83-A, p.259-270.

SALMON, P. (2000). Analysis of bone my micro-CT (personal notes).

SANTANA, L.S. (2007). **Tratamento de úlceras venosas por ultra-som de baixa intensidade**: avaliação por análise de imagem e imunohistoquímica. 126p. Dissertação

(Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SANT'ANNA, E.F., LEVEN, R.M., VIRDI, A.S., SUMNER, D.R.(2005). Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression, *Journal of Orthopaedic Research*, v. 23(3), p. 646-652.

SASOV, A.Y., DEWAELE, D, (2002). High resolution in vivo scanner for small animals. In: *Developments in x-ray tomography III*, Ulrich Bonse Ed., *Proceedings of SPIE*. v. 4503, p. 256-264.

SILVA, O.L.; REINBOLD, K.A.; POLLACK, S.R. (1993). In: BLANK, M. (Ed.). **Electricity and magnetism in biology and medicine**. San Francisco: San Francisco Press. p.905-908.

SUN, J. et al. (1999). Bone defect healing enhanced by ultrasound stimulation: an in vitro tissue culture model. **Journal of Biomedical Materials Research - A**, New York, v.46, n.2, p.253-261, Aug.

TAKIKAWA, T. (2001). Low-intensity pulsed ultrasound initiates bone healing in rat nonunion fracture model. **Journal of Ultrasound in Medicine**, Philadelphia, v.20, n.3, p.197-205, Mar.

ULRICH D, VAN RIETBERGEN B, LAIB A, RÜEGSEGG P (1999). The ability of three dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone, **Bone**, v. 25 (1), p. 55-60.

VELLOSO, G.R. (2005). Fraturas: origem e tratamentos. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasília, v.3, n.2, p.297-301, jul./dez.

ZHOU, S., SCHMELZ, A., SEUFFERLEIN, T., LI, Y., ZHAO, J., BACHEM, M.G (2004).. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound on human skin fibroblasts, **Journal of Biology and Chemistry**.v. 279(52), p.54463-54469.

WAARSING, J.H., DAY, J.S., WEINANS, H. (2004), An Improved Segmentation Method for In vivo microCT Imaging. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19 (10), p.1640-1650.

WARDEN, S.J., BENNELI K.L., MCMEEKEN, J.M., WARK. J.D. (2000). Acceleration of Fresh Fracture Repair: Using the Sonic Accelerated Fracture Healing System (SAPHS): A Review, **Calcified Tissue International** v.66, p.157-1.3,

WANG, S.J. et al. (1994). Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. **Journal of Orthopaedic Trauma**, Hagerstown, v.12, p.40-47.

WANG, F-S., KUO, Y-R., WANG, C-J. (2004). Nitric oxide mediates ultrasound-induced hypoxia-inducible factor-1 α activation and vascular endothelial growth factor - A expression in human osteoblasts, **Bone**, v. 35, p. 114-123.

YANG, K.H.et al. (1996). Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v.14, n.5, p.802-809.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comissão de Ética em Experimentação Animal
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110
Fax: (016) 3361.3176
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil
propq@power.ufscar.br - www.propq.ufscar.br

Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal nº 024/2009

Protocolo nº 025/2009

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar – na sua 34ª. Reunião, ocorrida em 18/08/2009, **APROVOU** o trabalho intitulado “**Quantificação do Reparo Ósseo por Microtomografia 3D po Raio-X**”, apresentado por Simoni Orlandi Introini, José Marcos Alves e Nelson Ferreira da Silva Junior.

São Carlos, 19 de agosto de 2009.

Prof.^a Dr.^a Keico Okino Nonaka
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal