

CARACTERIZAÇÃO DE ESTRUTURAS INTERNAS ÓSSEAS ATRAVÉS DAS
TÉCNICAS DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA
TRIDIMENSIONAL E FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Inayá Corrêa Barbosa Lima

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
EM ENGENHARIA NUCLEAR.

Aprovada por:

Prof. Ricardo Tadeu Lopes, D. Sc.

Profa. Maria Lucia de Farias Fleiuss, D. Sc.

Profa. Doris Rosenthal, D. Sc.

Prof. Joaquim Teixeira de Assis, D. Sc.

Prof. Marcelino José dos Anjos, D. Sc.

Prof. Edgar Francisco Oliveira de Jesus, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

MARÇO DE 2006

LIMA, INAYÁ CORRÊA BARBOSA

Caracterização de Estruturas Internas Ósseas através das Técnicas de Microtomografia Computadorizada Tridimensional e Fluorescência de Raios X [Rio de Janeiro] 2006

XIX, 167 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Nuclear, 2006)

Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.

1. Microtomografia Computadorizada
2. Fluorescência de Raios X
3. Estrutura Óssea

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

Aos amigos e familiares...

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de externar veementemente meu sentimento de agradecimento e carinho àquele que, mesmo nas horas mais penosas de minha vida durante esses quatro anos de doutorado, não deixou de fornecer sua consideração e ajuda acadêmica. A esse que, além de tudo, me forneceu liberdade para conduzir o estudo desenvolvido, facilitando, quando pôde, a inserção de novos pesquisadores no meu trabalho de tese. A essa grande pessoa, meu orientador prof. Dr. Ricardo Tadeu Lopes, o meu muitíssimo obrigada.

Não poderia deixar de lembrar de algumas outras pessoas que se fizeram muito importantes na realização da pesquisa aqui apresentada: a Profa. Maria Lúcia Fleiuss, pelo grande incentivo e “empurrão” inicial na procura de novas parcerias para o fornecimento de amostras ósseas, a Profa. Dra. Maria Pessoa, pela sua ajuda na limpeza das amostras ósseas deixando a disposição o dermestério de seu laboratório, a Profa. Dra. Maria das Graças pelo fornecimento das amostras iniciais de rato Wistar, a Profa. Dra. Mônica dos Santos pela sua colaboração e provimento das amostras ósseas dos animais submetidos ao protocolo de etanol, a Profa. Dóris Rosenthal pelo fornecimento dos animais que fizeram parte do ensaio de microfluorescência de raios X, a Profa. Dra. Maria Eugênia pela colaboração e empréstimo das amostras de biópsias ósseas humanas par serem analisadas via tomografia, ao prof. Dr. Edgar de Jesus, que sempre me encorajou e nunca se negou a ajudar e sanar as dúvidas iniciais surgidas quando me deparei com uma nova técnica de aplicação de raios X. E, é claro, não poderia deixar de faltar um grande agradecimento ao Prof. Dr. Marcelino dos Anjos, pela enorme empolgação e colaboração nos ensaios de fluorescência de raios X. Todos os docentes aqui citados contribuíram de forma significativa para a realização do intercâmbio ocorrido, durante todos os anos desse estudo, entre diversas áreas, tais como a nutrição, a biologia, a farmacologia, a medicina, a física e a engenharia.

O que seriam das pessoas desse mundo se não fossem os amigos? Amigos para todas as horas e momentos. Amigos não apenas para concordar e vivenciar as alegrias, mas sim, para partilhar as tristezas e decepções vividas. Tenho o prazer de pedir muito obrigada, por tudo isso e muito mais, a minha grande amiga Renata de Farias Barbosa.

Gostaria também agradecer a todos os funcionários do LIN, em especial ao Carlos Augusto e ao Sandro que tanto me ajudaram na manutenção do equipamento de microtomografia, e do LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron) que, de alguma forma, me ajudaram a completar este trabalho. Agradeço também ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa) pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos vocês meu muito obrigada.

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

CARACTERIZAÇÃO DE ESTRUTURAS INTERNAS ÓSSEAS ATRAVÉS DAS
TÉCNICAS DE MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA
TRIDIMENSIONAL E FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

Inayá Corrêa Barbosa Lima

Março / 2006

Orientador: Ricardo Tadeu Lopes.

Programa: Engenharia Nuclear

Uma avaliação de amostras biológica, como osso de pequenos animais pode ser desenvolvida com raios X. A microtomografia computadorizada tridimensional (μ CT) é uma técnica de imagem não invasiva que fornece um mapa da estrutura interna da amostra inspecionada, com uma resolução espacial da ordem de microns. Outra potente técnica utilizada para analisar esse tipo de material é a fluorescência de raios X (XRF), que é uma técnica de analítica superficial aceita como um excelente método para análise de elementos químicos. O maior desafio da pesquisa nas áreas biológicas nos últimos anos tem sido a determinação das concentrações de vários elementos em tecidos ósseos.

Nesse trabalho essas duas técnicas de raios X trabalham juntas, ou seja, uma complementando a outra, para caracterizar amostras de osso (humano e animal). Num primeiro momento foi utilizado um aparelho de microtomografia computadorizada que fica situado no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN). O segundo passo consiste em realizar a XRF aplicando dois métodos diferentes: a fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e a microfluorescência de raios X por radiação Síncrotron. O primeiro experimento foi feito também no LIN, e o segundo no LNLS, em Campinas, São Paulo.

Os resultados revelam que tanto a μ CT quanto a XRF são excelentes técnicas para analisar, inspecionar e caracterizar amostras ósseas.

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

CHARACTERIZATION OF BONE INTERNAL STRUCTURES BY
TRIDIMENSIONAL COMPUTED MICROTOMOGRAPHY AND X-RAY
FLUORESCENCE TECHNIQUES.

Inayá Corrêa Barbosa Lima

March / 2006

Advisor: Ricardo Tadeu Lopes

Department: Nuclear Engineering

Evaluation of biological specimens, such as bone of small animals can be accomplished with X-rays. The 3D microcomputed tomography (μ CT) is a non-invasive imaging technique that can produce a map of the internal structure of the inspected sample, in microns order of the space resolution. The distinct advantage of using this imaging technique to characterize the internal structure of bone samples is that is scalable for resolutions and is also useful for other human specimens, when higher resolutions are required. Another powerful technique used to inspect these kinds of materials is the x-ray fluorescence (XRF), which is a superficial analytical technique that is accepted as an excellent method to analyze chemical elements. A major goal for research in biomedical sciences over the last few decades has been to determine the concentrations of various elements in bone tissues.

In this work these two techniques work together, e.g., as a complement to each other, to characterize bone samples (human and animal). On the first moment, the specimens were used to the scan procedure in the microcomputer tomography that is located in the Nuclear Instrumentation Laboratory. The second step consist in doing the x-ray fluorescence by applying in two different methods: energy dispersive x-ray fluorescence and x-ray microfluorescence. To the first method, it was used a usual experiment setup also located at LIN. The second method was executed at the LNLS, in Campinas, São Paulo.

The results show that 3D micro-CT and XRF are powerful techniques to analyze, inspect and characterize bone sample.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
<i>I.1 – Introdução</i>	1
<i>I.2 - Revisão Bibliográfica</i>	1
I.2.1 - Tomografia Computadorizada.....	2
I.2.2 - Fluorescência de Raios X	13
CAPÍTULO II	19
<i>II. Considerações Teóricas</i>	19
II. 1. Raios X - Uma breve história	19
II. 2. Processos de Interação da Radiação com a matéria	20
II. 3. Registro da Radiação.....	28
II. 4. O Processo tomográfico.....	33
II. 4.1 – A Reconstrução	36
II. 4.2 – A Imagem	38
II. 4.3 – A Micro CT.....	40
II. 5. Parâmetros Ósseos Quantificados através da Micro-CT	43
II. 5.1. Parâmetros Ósseos Estruturais	43
II. 5.2. Parâmetro Ósseo Morfológico - Anisotropia bidimensional	50
II. 6 – A Técnica de Fluorescência de Raios X.....	53
II. 6.1 – Fluorescência de Raios X por dispersão em energia (EDXRF)	55
II. 6.2 – MicroFluorescência de Raios X por Radiação Síncrotron (μ XRF-SR)	62
CAPÍTULO III	65
<i>III. Metodologia</i>	65
III. 1. MicroTomografia Computadorizada	66
III.1.1. O Equipamento para a Tomografia Computadorizada	66
III. 1.2. As Amostras Ósseas em Micro CT	70
III.1.3. A Aquisição das Tomografias	73
III.1.4. A Reconstrução das Imagens.....	73
III.1.5. A Quantificação das Amostras Ósseas	75
III. 2. Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia	78
III.2.1. O Arranjo Experimental	78

III. 2.2. As Amostras em EDXRF	79
III. 2.3. Avaliação da Metodologia utilizada em EDXRF	80
III. 2.4. Calibração do Sistema.....	81
III.2.5. O fator Absorção.....	82
III.2.6. Análise dos Espectros e Limite de Detecção.....	83
III.2.7. Cálculo das Concentrações Elementares.....	85
III. 3. Micro XRF-SR	87
III.3.1. O Arranjo Experimental	87
III. 3.2. As Amostras	89
III. 3.3. Calibração do Sistema.....	91
III.3.4. Cálculo das Concentrações Elementares e Visualização das Imagens.....	92
CAPÍTULO IV.....	93
IV. Resultados.....	93
IV. 1. Micro CT	93
IV.1.1 – Grupo 1 (animais machos e fêmeas controle com 3 meses de idade).....	93
IV.1.2 – Grupo 2 (animais machos e fêmeas com 24 e 12 meses de idade respectivamente submetidos ou não ao protocolo de etanol).....	98
IV.1.4 – Grupo 3 (biópsias humanas)	104
IV. 2. Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia.....	109
IV.2.1 – Resultados para a região da cabeça femoral.....	111
IV 3. Micro XRF-SR.....	117
CAPÍTULO V	131
V. Análise dos Resultados	131
V.1 - Tomografia Computadorizada	131
<u>V.1.1 – Grupo 1 (animais machos e fêmeas com 3 meses de idade)</u> .	131
<u>V.1.2 – Grupo 2 (animais machos e fêmeas com 24 e 12 meses respectivamente, de idade:controle e submetidos ao protocolo de etanol)</u>	132
<u>V.1.3 – Grupo 3 (biópsias humanas)</u>	135
V.2 - Fluorescência de Raios X.....	136
<u>V.2.1 – EDXRF</u>	136

V.2.2 – μ XRF-SR.....	138
CAPÍTULO VI.....	140
VI. Conclusão.....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
ANEXO.....	153
A. O OSSO.....	153
A.1. O Tecido Conjuntivo.	153
A.2. Tecido Ósseo.....	156
A.3. Classificação e Formação Óssea.	157
A.4. Remodelação Óssea	161
A.5. O importante papel do Cálcio no Osso.	163
A.6. Osteoporose: Uma Doença Associada à Perda Óssea.	165

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA II.1 - ESPECTRO COMBINADO DE RAIOS X.....	20
FIGURA II.2 - PROCESSO DE GERAÇÃO DA LINHA CARACTERÍSTICA K_{α}	21
FIGURA II.3 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO EFEITO FOTOELÉTRICO.....	22
FIGURA II.4 - PROCESSO DE EMISSÃO DE UM ELÉTRON AUGER.....	22
FIGURA II.5 - EFEITO COMPTON	23
FIGURA II.6 - ÂNGULO DE ESPALHAMENTO COMPTON PARA O FÓTON E PARA O ELÉTRON ESPALHADO, PARA DIFERENTES ENERGIAS.....	24
FIGURA II.7 - PRODUÇÃO DE PARES	24
FIGURA II.8 - COEFICIENTES DE ATENUAÇÃO TOTAL E ABSORÇÃO PARA A ÁGUA E PARA O AR. AMBAS AS CURVAS SÃO MUITO SEMELHANTES DEVIDO À PROXIMIDADE DOS NÚMEROS ATÔMICOS EFETIVOS DE AMBOS OS MEIOS (7,5 E 7,8, RESPECTIVAMENTE).	25
FIGURA II.9 - ESQUEMA DA ATENUAÇÃO DOS RAIOS X.....	27
FIGURA II.10 – PROCESSO DE MEDIÇÃO NO DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA.....	30
FIGURA II.11 – PROCESSO DE REGISTRO NO DETECTOR DE CINTILAÇÃO.....	30
FIGURA II.12 – ESTRUTURA INTERNA DE UM INTENSIFICADOR DE IMAGEM.....	31
FIGURA II.13 – JANELA DE ENTRADA – UMA AMPLIFICAÇÃO.....	32
FIGURA II.14 – JANELA DE SAÍDA - UMA AMPLIAÇÃO.....	32
FIGURA II.15 - PROJEÇÃO BIDIMENSIONAL	33
FIGURA II.16 - ILUSTRAÇÃO DE UMA PROJEÇÃO ATRAVÉS DE UM OBJETO EM UM ÂNGULO DE VISÃO ϕ FORMANDO UMA FUNÇÃO P.....	35
FIGURA II.17 - ILUSTRAÇÃO DE UM SINOGRAMA.....	35
FIGURA II.18 - REPRESENTAÇÃO DE “PIXEL” E “VOXEL”. “PIXEL” É A REPRESENTAÇÃO BÁSICA DE UM ELEMENTO BIDIMENSIONAL EM UMA IMAGEM DIGITAL. VOXEL É A REPRESENTAÇÃO 3D, COM A TERCEIRA DIMENSÃO REPRESENTANDO A ESPESSURA DO “SLICE”.....	38
FIGURA II. 19 – (A) IMAGEM-MATRIZ (RADIOGRAFIA DE UM DENTE REGISTRADA COM UM APARELHO MICROFOCUS A 40 kV E 0,2 mA: IMAGEM EM TONS DE CINZA; (B) PERFIL DO NÍVEL DE CINZA.....	39
FIGURA II.20 - TOMOGRAFIA 2D	40
FIGURA II.21 - TOMOGRAFIA 3D	40

FIGURA II. 22 – CAPACIDADE DE CARGA DO ALVO.....	41
FIGURA II. 23 - PRINCÍPIO DE COMPOSIÇÃO DE UM APARELHO DE CT.....	42
FIGURA II.24 – LINHAS E PONTOS NA SEÇÃO PLANA.	43
FIGURA II.25- ESQUEMA ILUSTRATIVO MOSTRANDO A REPRESENTAÇÃO DE P_p E P_L , NUMA MATRIZ SUPERPOSTA À IMAGEM 8X6.	44
FIGURA II.26– PROCESSO DE SEGMENTAÇÃO: (A) IMAGEM ORIGINAL, (B) IMAGEM BINARIZADA, (C) IMAGEM SEGMENTADA, (D) HISTOGRAMA DA IMAGEM.	48
FIGURA II.26– ILUSTRAÇÃO DA ANISOTROPIA DE CADA UMA DAS IMAGENS. O EIXO MAIOR DA ELIPSE REPRESENTA A DIREÇÃO PREFERENCIAL.	51
FIGURA II.27– REPRESENTAÇÃO DE MODELOS ATÔMICOS: (A) GEOMÉTRICA, ONDE OS ORBITAIS SÃO TRAJETÓRIAS GEOMÉTRICAS, PERCORRIDAS POR ELÉTRONS; (B) QUÂNTICA, ONDE OS ORBITAIS SÃO REPRESENTADOS POR NUVENS ENVOLVENDO O NÚCLEO, ONDE PARA CADA POSIÇÃO GEOMÉTRICA EXISTE UMA PROBABILIDADE ASSOCIADA DE ENCONTRAR O ELÉTRON.....	54
FIGURA II.28– ESQUEMA DOS NÍVEIS DE ENERGIA PARA A FORMAÇÃO DOS RAIOS X CARACTERÍSTICOS DE UM ELEMENTO (REPRESENTAÇÃO DIDÁTICA): (A) TRÊS DOS INÚMEROS NÍVEIS DE ENERGIA DE UM ÁTOMO, (B) CINCO DOS INÚMEROS NÍVEIS DE ENERGIA, (C) PRODUÇÃO DOS RAIOS X CARACTERÍSTICOS.....	55
FIGURA II.29– REPRESENTAÇÃO DIDÁTICA: (A) ARRANJO EXPERIMENTAL DE EDXRF, (B) TÍPICO ESPECTRO REGISTRADO PELO DETECTOR.	57
FIGURA II.30 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA GEOMETRIA DO MÉTODO DA TRANSMISSÃO DA RADIÇÃO: (A) MEDIDA DE I_o , (B) MEDIDA DE I_i	59
FIGURA II.31 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SINAL PROVENIENTE DA RADIAÇÃO DE FUNDO E LÍQUIDO.....	61
FIGURA II.32 – REPRESENTAÇÃO DO PERFIL (A) E DA IMAGEM(B) QUE SE ADQUIRE NA μ XRF.	63
FIGURA II. 33 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO “SET-UP” TÍPICO DE XRF-SR.	64
FIGURA III.1 – ESQUEMA GERAL DO SISTEMA DE RAIOS X EM TEMPO REAL MICROFOCO.	66
FIGURA III.2 - TUBO DE RAIOS X MICROFOCO E DETALHE DO ALVO E DA JANELA DE SAÍDA.	67
FIGURA III.3 - DETALHE DO POSICIONAMENTO DA CÂMERA DIGITAL ACOPLADA AO INTENSIFICADOR DE IMAGEM.	68
FIGURA III.4. - BRAÇO MECÂNICO DE POSICIONAMENTO DAS AMOSTRAS.	69

FIGURA III.5 - INTERFACE DO PROGRAMA DE RECONSTRUÇÃO.	70
FIGURA III.6 – FOTO DE UM FÊMUR DE RATO WISTAR.	72
FIGURA III.7 – FOTOS DAS BIÓPSIAS ÓSSEAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE μ CT.....	72
FIGURA III.8 – DIAGRAMA DO ALGORITMO DE RECONSTRUÇÃO.	74
FIGURA III. 9 – INTERFACE DO PROGRAMA DE RECONSTRUÇÃO.....	75
FIGURA III.10 - INTERFACE DOS DADOS DE ENTRADA FORNECIDAS PELO PROGRAMA DE QUANTIFICAÇÃO.	76
FIGURA III.11 – DIAGRAMA DO ALGORITMO DE QUANTIFICAÇÃO.	76
FIGURA III.12 – REPRESENTAÇÃO DA ESCOLHA DO R.O.I. (A) IMAGEM RADIOGRÁFICA DE UM OSSO DE RATO SEM PATOLOGIA ASSOCIADA COM 12 MESES DE IDADE, (B) FOTO COM 2X DE AUMENTO DE UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM 4 MESES DE IDADE.	77
FIGURA III.13 – FOTO DO ARRANJO EXPERIMENTAL DE EDXRF.	78
FIGURA III.14 – FOTO DA AMOSTRA DE REFERÊNCIA.	80
FIGURA III. 15 – FOTO DE UM EXEMPLO DE UM PADRÃO, UTILIZADO NO LEVANTAMENTO DA CURVA DE SENSIBILIDADE.....	81
FIGURA III.16 – INTERFACE DO PROGRAMA AXIL: UM DOS PASSOS REQUERIDOS PARA PROCEDER A CONVERSÃO DOS ESPECTROS.	84
FIGURA III.17 – EXEMPLO DE UM ESPECTRO JÁ CONVERTIDO EM EXTENSÃO *.SPE.	84
FIGURA III.18 – EXEMPLO DE UM ESPECTRO AJUSTADO.	85
FIGURA III.19 – INTERFACE DO PROGRAMA DE QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ELEMENTAR.	86
FIGURA III. 20 – VISTA PANORÂMICA DO ANEL NO LNLS.	87
FIGURA III. 21 – DETALHE DA INSTRUMENTAÇÃO NA LINHA XRF.	88
FIGURA III.22 – ESQUEMA DO ARRANJO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA μ XRF-SR.....	88
FIGURA III. 23 – FOTO DE UMA AMOSTRA.....	90
FIGURA IV.1 – RESULTADO DA ANISOTROPIA –FÊMEAS COM 3 MESES DE IDADE.	94
FIGURA IV.2 – RESULTADO DA ANISOTROPIA –MACHOS COM 3 MESES DE IDADE.	95
FIGURA IV.3 – VISUALIZAÇÕES 2D – FÊMEAS COM 3 MESES DE IDADE.....	96
FIGURA IV.4 – VISUALIZAÇÕES 2D – MACHOS COM 3 MESES DE IDADE.	96
FIGURA IV.5 – VISUALIZAÇÕES 3D – FÊMEAS COM 3 MESES DE IDADE.....	97
FIGURA IV.6 – VISUALIZAÇÕES 3D – MACHOS COM 3 MESES DE IDADE.	97
FIGURA IV.7 – VISUALIZAÇÕES 3D – FÊMEAS_CONTROLE COM 12 MESES DE IDADE.....	98
FIGURA IV.8 – VISUALIZAÇÕES 3D – FÊMEAS_ ETANOL COM 12 MESES DE IDADE.	98

FIGURA IV.9 – VISUALIZAÇÕES 3D – MACHOS_CONTROLE COM 24 MESES DE IDADE.....	99
FIGURA IV.10 – VISUALIZAÇÕES 3D – MACHOS_ETANOL COM 24 MESES DE IDADE.....	99
FIGURA IV.11 – “BOX-PLOT” DAS ÁREAS AVALIADAS: (A) A (E) SÃO OS RESULTADOS DE TODOS OS PARÂMETROS NOS DOIS MÉTODOS (2D E 3D), (F) A (G) SÃO OS PRINCIPAIS PARÂMETROS DO MÉTODO 3D.	100
FIGURA IV.12 – HISTOGRAMA DAS IMAGENS (CABEÇA FEMORAL) – A ESCOLHA DO VALOR DE “THRESHOLD” (T): (A) IMAGEM ORIGINAL, (B) T=141, (C) T=117, (D) T=107, (E) T=91, (F) T=73, (G) T=60.....	101
FIGURA IV.13 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE “THRESHOLD” (TH) E BV/TV..	104
FIGURA IV.14 – VISUALIZAÇÕES 2D DE TODAS AS BIÓPSIAS ANALISADAS: PARA CADA AMOSTRA FOI ESCOLHIDO ALEATORIAMENTE UM “SLICE” DA RECONSTRUÇÃO.....	106
FIGURA IV.15 – VISUALIZAÇÕES 3D DE TODAS AS BIÓPSIAS HUMANAS.	107
FIGURA IV.16 – COMPORTAMENTO DE BV/TV AO LONGO DAS BIÓPSIAS HUMANAS.	108
FIGURA IV.17 – EXEMPLO DE UM ESPECTRO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE EDXRF, PARA UMA AMOSTRA DE OSSO (CABEÇA FEMORAL).....	109
FIGURA IV.18 – DETALHE DO ESPECTRO ANTERIOR.	109
FIGURA IV.19 – CURVA DE SENSIBILIDADE – EDXRF.	110
FIGURA IV.20 – CURVA DE ABSORÇÃO – EDXRF.....	110
FIGURA IV.21 – CURVA DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) – EDXRF.....	111
FIGURA IV.22 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS DE RATOS JOVENS E IDOSOS – EDXRF (ELEMENTOS MAJORITÁRIOS).....	112
FIGURA IV.23 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS DE RATOS JOVENS E IDOSOS – EDXRF (ELEMENTOS TRAÇO).	112
FIGURA IV.24 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS IDOSAS (ANIMAIS DE 12 E 24 MESES): CONTROLE E SUBMETIDAS AO PROTOCOLO DE ETANOL	115
FIGURA IV.25 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS DE RATOS JOVENS E IDOSOS – CÔNDILOS -EDXRF (ELEMENTOS MAJORITÁRIOS).....	116
FIGURA IV.26 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS DE RATOS JOVENS E IDOSOS – CÔNDILOS -EDXRF (ELEMENTOS TRAÇO).	116
FIGURA IV.27 – CURVA DE SENSIBILIDADE – μ XRF.	117
FIGURA IV.28 – CURVA DE ABSORÇÃO – μ XRF.	118
FIGURA IV.29 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS MEDIDAS NAS AMOSTRAS ÓSSEAS PERCENTES AO GRUPO 4.	119

FIGURA IV.30 EXEMPLO DOS PERFIS ADQUIRIDOS PARA UMA AMOSTRA DE RATA CONTROLE.	120
FIGURA IV.31 - EXEMPLO DOS PERFIS ADQUIRIDOS PARA UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA.	121
FIGURA IV.32 EXEMPLO DOS PERFIS ADQUIRIDOS PARA UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO.	122
FIGURA IV.33 - EXEMPLO DAS IMAGENS DA CORTICAL, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE UMA AMOSTRA DE RATA DE CONTROLE.	123
FIGURA IV.34 EXEMPLO DAS IMAGENS DA REGIÃO TRABECULAR, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE UMA AMOSTRA DE RATA DE CONTROLE.....	124
FIGURA IV.35 EXEMPLO DAS IMAGENS DE CORTICAL+TRABÉCULA, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA.	125
FIGURA IV.36– EXEMPLO DAS IMAGENS DE CORTICAL+TRABÉCULA, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO.	126
FIGURA IV.37 - EXEMPLO DAS IMAGENS DAS TRABÉCULAS, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE OUTRA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO.	127
FIGURA IV.38 - EXEMPLO DAS IMAGENS DAS TRABÉCULAS, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE OUTRA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO.	128
FIGURA IV.39 - COMPARAÇÃO ENTE AS IMAGENS OBTIDAS PARA O CÁLCIO E ESTRÔNCIO.	129
FIGURA IV.40 – EXEMPLOS DE ALGUMAS IMAGENS ADQUIRIDAS (RATAS CASTRADAS COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO) NO MOMENTO DA AQUISIÇÃO DOS DADOS DE μ XRF-SR.	130
FIGURA A.1 – COMPONENTES DO TECIDO CONJUNTIVO.....	155
FIGURA A.2 – VARIANTES DO OSSO: CORTICAL E TRABÉCULA.	158
FIGURA A.3 – COMPOSIÇÃO TRABECULAR E CORTICAL NO ESQUELETO HUMANO.....	158
FIGURA A.4 – ESTRUTURAS DO FÊMUR.....	160
FIGURA A.5 – ESQUEMA DA REMODELAÇÃO ÓSSEA.	162
FIGURA A.6 – VISUALIZAÇÕES DE OSSO NORMAL E OSSO COM OSTEOPOROSE	165

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA II. 1 - PREDOMINÂNCIA DE CADA EFEITO DE ACORDO COM A FAIXA ENERGÉTICA	25
TABELA II.2 – LISTA DOS SÍMBOLOS BÁSICOS E SUAS DEFINIÇÕES.....	43
TABELA II.3 – RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS MEDIDOS (O) E CALCULADOS(□).....	45
TABELA III. 1 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO ENSAIO MICROTOMOGRÁFICO.	73
TABELA III.2 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO SISTEMAUTILIZADO PARA EDXRF.....	79
TABELA III.3 - CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DO SISTEMA DE EDXRF.....	79
TABELA III.4 – INFORMAÇÕES SOBRE OS PADRÕES UTILIZADOS NA CALIBRAÇÃO DO SISTEMA.....	82
TABELA III. 5 – ESPECIFICAÇÕES DO ALVO MULTIELEMENTAR E DA FONTE DE AM-241..	83
TABELA III. 6 – CARACTERÍSTICAS DA LINHA XRF (4 - 23 KEV).	89
TABELA III.7 – INFORMAÇÕES SOBRE OS PADRÕES UTILIZADOS NA CALIBRAÇÃO DO SISTEMA.....	91
TABELA IV.1 – VALORES DAS ÁREAS QUANTIFICADAS PARA OS RATOS COM 3 MESES DE IDADE	93
TABELA IV.2 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA 2D PARA OS RATOS COM 3 MESES DE IDADE.	93
TABELA IV.3 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA 3D PARA OS RATOS COM 3 MESES DE IDADE.	94
TABELA IV.4 – RESULTADOS DOS PARÂMETROS ANISOTRÓPICOS PARA OS ANIMAIS COM 3 MESES DE IDADE.	95
TABELA IV.5 – RESULTADOS 2D DO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA PARA OS ANIMAIS CONTROLE E SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ETANOL.....	102
TABELA IV.6 – RESULTADOS 3D DO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA PARA OS ANIMAIS CONTROLE E SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ETANOL.....	102
TABELA IV.7 – RESULTADOS 2D DO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA DAS BIÓPSIAS HUMANAS.	105
TABELA IV.8 – RESULTADOS 3D DO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA DAS BIÓPSIAS HUMANAS.	105
TABELA IV.9 – RESULTADO DAS CONCENTRAÇÕES.....	113

TABELA IV.10 – RESULTADO DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (R) PARA OS ELEMENTOS ENCONTRADOS PARA A AMOSTRA DE RATO MACHO_CONTROLE...	114
TABELA A.1 – ALGUMAS FUNÇÕES DO OSSO	156
TABELA A.2 – FUNÇÕES DO CÁLCIO NO ESQUELETO.	163

LISTA DE ABREVIACÕES

CT – Tomografia Computadorizada.

μ CT - Microtomografia computadorizada por raios X.

BV – Volume ósseo.

TV – Volume total da amostra.

BS – Superfície óssea.

BV/TV – fração de volume ósseo

BS/BV – relação entre superfície e volume ósseos

TbN – número de trabéculas.

TbTh – separação trabecular.

TbSp – Espaçamento trabecular.

XRF – Fluorescência de Raios X

EDXRF - Fluorescência de Raios X por Dispersão em energia.

μ XRF – Microfluorescência de raios X

SR – Radiação Síncrotron.

μ XRF-SR - Microfluorescência de raios X por Radiação Síncrotron.

P - Número de elementos pontos ou de pontos testes.

P_p - Fração de pontos. Número de pontos (na área característica) por pontos teste.

L - Comprimento da linha de teste

PI - Número de pontos de intersecção por unidade de comprimento das linhas de teste.

P_A - Número de pontos por unidade de área teste.

A - Área teste.

A_A - Fração de área.

S - Superfície ou área da interface.

S_v - Área superfície por unidade de volume teste.

V - Volume teste.

V_v - Fração de volume. Volume da característica por unidade de volume teste.

TH – Nível de “Threshold”.

LMD – Limite Mínimo de Detecção.

ROI – Região de interesse.

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

LIN – Laboratório de Instrumentação Nuclear.

CAPÍTULO I

I.1 – Introdução

A osteoporose é uma doença que acomete os ossos, caracterizada pela perda de massa óssea e conseqüente fragilidade de sua arquitetura. Questões sobre as estruturas internas bem como a distribuição e papel de certos minerais nos ossos ainda não estão totalmente elucidadas. Portanto, se torna muito importante a investigação desses parâmetros para que seja possível aumentar o conhecimento de tal estrutura e auxiliar o entendimento das patologias associadas à tal estrutura.

Nesse âmbito, esse trabalho de tese tem por objetivo principal investigar as estruturas internas e externas de amostras ósseas a partir de duas técnicas que envolvem raios X: Microtomografia Computadorizada Tridimensional e Fluorescência de raios X, respectivamente.

Uma vez apresentadas as principais referências bibliográficas sobre o assunto em questão, serão relatadas as introduções teóricas da técnica de tomografia computadorizada por raios X e da de quantificação óssea, no capítulo II. Já no capítulo subsequente, será descrita a metodologia utilizada nesse trabalho. O capítulo IV conterá os resultados obtidos juntamente com algumas inferências. E, por fim, no capítulo V serão expostas as conclusões e expectativas futuras. Ao final dos capítulos, ter-se-á também um anexo contendo uma pequena explicitação sobre a estrutura óssea (composição, fisiologia e anatomia).

I.2 - Revisão Bibliográfica

Nessa sessão será apresentado um breve histórico sobre a utilização da tomografia computadorizada e a técnica de fluorescência por raios X na análise de estruturas biológicas. Para melhor entendimento da morfologia óssea, encaminhe-se ao anexo.

I.2.1 - Tomografia Computadorizada

Os raios X foram descobertos por Roëntgen, em 1895 e desde então foram várias as aplicações desenvolvidas. Em seu artigo, HESSENBRUCH [1] discorre sobre a história dos raios X desde sua descoberta por Roëntgen, passa pelas aplicações na medicina e termina alertando sobre sua proteção. A habilidade desse raio de "ver" através da pele causou muito interesse e curiosidade por parte do público e também dos cientistas. No período da 1ª. Guerra Mundial, a radiografia para diagnóstico atingiu seu topo. Em 1920, a radiologia se tornou uma rotina, e o número de radiologistas também cresceu como pode ser visto em WEBSTER *et al* [2]. Nos anos 30 e 40, muita gente morreu em muitos países da Europa por conta do desconhecimento dos malefícios causados pela radiação X. Nos anos 60, tem-se a mamografia como uma técnica capaz de detectar o início do aparecimento de câncer a baixas doses de raios X. Nos anos 70, os aceleradores lineares vieram para dominar o mercado das fontes de raios X surgindo a Tomografia Computadorizada (CT) mais eficaz na diferenciação dos tecidos. Nos anos 80 e 90, o uso do computador para processar e guardar informações de diagnóstico foi um dos principais desenvolvimentos na tecnologia de diagnóstico por raios X. Os raios X são agora, não apenas um uso rotineiro na medicina e nos estudos acadêmicos, mas sim um hábito em muitas atividades, tal como na indústria, como mostra LIN *et al* [3]. São diversas as aplicações da tomografia computadorizada por raios X e, entre elas pode ser destacado o estudo de estruturas internamente conexas, tal como o osso poroso. O grande interesse por esse tipo de estrutura é que através da microtomografia computadorizada por raios X (μ CT) pode ser feita a avaliação 2D e 3D de toda a arquitetura trabecular óssea sem haver a destruição da amostra.

A análise das estruturas ósseas está baseada em conceitos de esterologia, mostrados posteriormente no capítulo II. Entre os muitos parâmetros que podem ser quantificados destacam-se: BV/TV (fração de volume ósseo), BS/BV (relação entre superfície e volume ósseos), TbN

(densidade trabecular), TbTh (espaçamento entre as trabéculas), TbSp (separação trabecular), conectividade e a direção preferencial das trabéculas ósseas (anisotropia). Esse estudo vem realizado em diferentes tipos de ossos, com diferentes patologias, tanto em amostras de osso humano quanto em amostras de animais, tal como rato. Serão apresentados a seguir os resumos de alguns trabalhos que foram fundamentais para o entendimento do tipo de avaliação a que se propõe fazer nesse estudo.

FLANNERY *et al* [4] descreveram o princípio de transmissão de raios X na tomografia computadorizada ressaltando sua aplicabilidade na área médica mostrando os seus primeiros resultados em amostras de tecido canceroso. MORTON *et al* [5] também apresentaram resultados na área biológica com auxílio da microtomografia computadorizada por raios X. Nesse estudo, destaca-se o desenvolvimento de um “set-up” com um detector a gás fazendo parte do sistema de detecção. As amostras utilizadas foram de pássaros e as imagens foram tomografadas com um tamanho de “pixel” igual a 20 e 8 micrômetros.

TABOR *et al* [6], estudaram a influência da resolução da imagem no poder de discriminação dos parâmetros da arquitetura do osso trabecular. Imagens de 200 μm de resolução de osso trabecular adulto e jovem foram coletadas (75 e 27 anos respectivamente). Diferentes parâmetros da arquitetura foram quantificados havendo uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. A partir desse momento, a resolução da imagem foi degradada artificialmente e a diferença estatística anteriormente observada ainda permaneceu para parâmetros que dependem apenas das características gerais da estrutura trabecular. Os parâmetros que satisfazem essas condições são: número de Euler (definido como o número de elementos conectados menos o número de buracos), área da cavidade medular, espaçamento trabecular, e volume trabecular. A diferença estatisticamente significativa desaparece para parâmetros que dependem do número e da área das partes desconexas do espaço medular ou da estrutura trabecular de uma maneira não-linear.

Um outro exame sobre a influência da resolução espacial da microtomografia na avaliação dos ossos de rato foi feito por YANG *et al* [7]. Esse trabalho ilustrou que, com a resolução de 15 μ m, foi perceptível uma mudança estrutural óssea, havendo uma alteração da tíbia entre os dois grupos amostrais estudados.

BJORNDAL *et al* [8] fizeram uma avaliação qualitativa da relação existente entre a macroestrutura externa e interna de dentes através da microtomografia computadorizada por raios X. Esse estudo revelou que com uma resolução espacial de 100 μ m consegue-se identificar as regiões de interesse.

Em seu estudo, WANG *et al* [9] desenvolveram um algoritmo de reconstrução de imagens tomográficas para feixes em cone a partir de um outro com feixe em paralelo, mostrando a aplicabilidade para a correção do problema de endurecimento de feixe: processo esse que gera uma série de artefatos nas imagens tomográficas.

SAKELLARIOU *et al* [10] mostraram a vantagem da utilização da μ CT em aplicações da física em meso escalas, realçando as características e facilidades de um experimento envolvendo a referida técnica. Sua instrumentação está baseada num feixe de raios X em paralelo com fatores de magnificação desde 1x até 100x e um detector tipo CCD com 2048 x 2048 (16 bits) de resolução.

MARTÍN-BADOSA *et al* [11], discutiram sobre o desenvolvimento de uma ferramenta para analisar a microestrutura óssea de ratos, através da microtomografia 3D. Uma vez definida uma região de interesse para a realização da quantificação da estrutura óssea, as regiões da cortical e das trabéculas foram separadas automaticamente pelo "software" desenvolvido. Essa separação é realizada com base no histograma do volume da imagem reconstruída. A análise morfológica e topológica foi feita aplicando-se dois modelos diferentes tanto na região da cortical quanto na região interna das trabéculas. As amostras utilizadas eram de 16 ratos machos que foram

sacrificados com 16 semanas de idade, dentre os quais oito eram pertencentes ao grupo controle e os demais submetidos a um modelo de perda de massa óssea. Além das quantificações usuais de parâmetros estruturais foi investigada também a porosidade das amostras, através da análise da estruturas e tamanho dos poros nas corticais. Os resultados indicaram que a análise feita com base tanto do modelo independente quanto no modelo dependente, leva a uma mesma conclusão para os parâmetros estruturais investigados. Entretanto, os valores absolutos diferem e são mais acurados se for utilizado o modelo independente. Em contrapartida, nenhuma mudança na conectividade foi observada, nos dois modelos para os dois grupos de animais.

HANSON [12] apresentaram um método alternativo para qualificar o osso utilizando μ CT, "in vitro". O método propôs a aquisição de imagens longitudinais (imagens que se assemelham mais com as adquiridas na histomorfometria convencional) ao longo do osso, visto que a maioria das aquisições é feita na direção vertical da amostra óssea. Foram feitos levantamentos de BV (volume ósseo), BS (superfície óssea), TbTh, TbN entre outros em ambas as direções do osso. Na direção vertical (comumente realizada) a resolução da imagem foi de 12 μ m, já na direção horizontal foram utilizadas duas: 8 e 16 μ m. As quantificações foram feitas em 1mm³ da amostra e, os resultados mostram uma diferença entre as duas direções: para BS, BV, TbN e TbTh houve uma diminuição de seus resultados quando quantificados na direção horizontal, acontecendo o inverso para TbSp. Para as quantificações 2D, TbN, TbTh, BV/TV e BS/TV aumentaram, enquanto que TbSp e BS/BV diminuíram.

PATEL *et al* [13], mostraram que a técnica de microtomografia computadorizada é uma excelente ferramenta para análises qualitativas e quantitativas de microestruturas. Com o auxílio dessa potente técnica, investigaram a variação da arquitetura óssea do joelho com respeito a sua região e profundidade. Foram utilizadas 11 amostras de joelhos incluindo a patela, o fêmur distal e a tíbia proximal de cadáveres entre 59 e 74 anos. Do total de amostras, 8 foram classificadas como normais e as demais com algum

tipo de artrite. Foram estudados os parâmetros: BV/TV, TbN, TbSp e TbTh, e as análises realizadas com base nos primeiros 6mm de profundidade da amostra. Nos primeiros 6 mm de profundidade da amostra os parâmetros sofreram um acréscimo significativo e após esse valor se estabilizaram, não havendo, portanto uma variação relevante. Quando relacionados com a localização anatômica, fêmur e tíbia, os mesmos se mostraram maiores na segunda região, com exceção de TbSp que obteve um comportamento inverso dos demais. Comparando as amostras normais com as que apresentavam algum tipo de artrite, a maior diferença significativa é observada nos primeiros 6 mm de profundidade do compartimento medial da tíbia. Os valores de BV/TV e TbTh são menores que os demais para as amostras com artrite, com exceção do parâmetro TbN que não apresentou variação estatisticamente significativa.

A quantificação óssea através da μ CT, tanto em humanos quanto em qualquer animal, esbarra em um sério problema: nível de "threshold" utilizado para efetuar a binarização das imagens. HARA *et al* [14], estudaram como os parâmetros morfológicos e mecânicos derivados da microtomografia podem ser afetados por pequenos erros na estimativa de valores de "threshold", quando se envolve variação de estruturas ósseas e diferentes frações volumétricas. Para tal utilizaram amostras de vértebras de porcas com 6, 23 e 230 semanas de idade e para cada grupo utilizaram cinco valores para o "threshold" (TH) espaçados em 0,5 %. As imagens tridimensionais mostraram diferenças na estrutura trabecular para diferentes valores de TH, apresentando um aspecto mais fino para baixos valores e até uma desconexão para altos valores.

Quando se está interessado em uma análise quantitativa, a diferença entre os valores do referido parâmetro é mais significativa para amostras com uma fração de volume ósseo menor que 0,15 e essa variação é linear, ou seja, uma variação de 0,5% no valor de TH causa uma diferença de 5% nos valores de fração de volume ósseo.

Quanto ao número trabecular e a anisotropia essa variação pode ser negligenciada. Isso mostra que a relação do TH é muito importante para a

acurácia da fração volumétrica e das propriedades mecânicas, especialmente para baixos valores desse parâmetro.

Outro relevante trabalho envolvendo nível de TH foi apresentado por RUEGSEGGER *et al* [15]. Eles investigaram, através da μ CT, a arquitetura óssea de biópsias da crista ílfaca com 8 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento. Nesse estudo foi ressaltado o fato dos índices estruturais, determinados através da μ CT, serem dependentes dos valores de TH utilizados na binarização das imagens quantificadas. Como suas imagens possuíam uma relação de contraste osso/medula muito alto ($\sim 1/10$), eles utilizaram um valor de TH fixo, fazendo com que o processo de segmentação fosse mais rápido e mais eficiente. O número trabecular se mostrou independente do nível de TH escolhido. Com isso tem-se que a microtomografia computadorizada é uma técnica não destrutiva relativamente rápida e precisa para a determinação de índices ósseos tridimensionais.

LOVERIDGE *et al* [16] realizaram um estudo sobre a fragilidade óssea e a densidade de mineralização óssea da região do colo do fêmur. Para tal, utilizaram biópsias de indivíduos de ambos os gêneros com idades entre 72 e 90 anos. O estudo demonstrou que a densidade mineral óssea é significativamente menor na região do colo femoral em pacientes que possuem fraturas provenientes de pequenos traumas comparados àqueles que possuem fraturas relacionadas à idade (osteoporose). Essa redução acontece tanto na região cortical quanto na região trabecular do osso, em todos os quadrantes da região estudada. A relação entre a mineralização, micro arquitetura e a fragilidade óssea tende a ser não linear. Com isso, pequenas variações nessas propriedades levam a uma mudança marcante nos aspectos de fragilidade óssea.

Diversos fatores podem causar balanço negativo na remodelação óssea. Isso pode ocorrer por grande estímulo ao processo de reabsorção, como nos casos do hipogonadismo (menopausa), carência de cálcio e conseqüente elevação do paratormônio e excesso de hormônio tireoidiano, ou por declínio

do processo de formação, como no envelhecimento. Em ambas as circunstâncias, a quantidade de osso removido será maior que a quantidade formada, e a consequência serão a redução da massa óssea e da qualidade óssea (menor resistência), características da osteoporose. O excesso de glicocorticóides desacopla o processo de remodelação, trazendo aumento da reabsorção e inibição da formação por apoptose de osteoblastos e osteócitos. A seguir serão apresentados trabalhos sobre as mudanças ocorridas no osso em detrimento do processo de envelhecimento, da ingestão abusiva de álcool e do uso de estrogênio.

RAO *et al* [17], através da microtomografia, com uma tensão de operação de 30 keV, mostraram que ratos jovens possuem uma estrutura mais densa do que ratos idosos.

BARBIER *et al* [18] reportaram sobre a visualização e avaliação da arquitetura óssea de rato utilizando micro CT. A avaliação é feita sobre a análise de valores de BMC (“bone mineral content”). Esses autores afirmaram que, a através dessa técnica, pode-se realizar um estudo da estrutura óssea dos ratos, mas apenas “ex vivo”, fato esse explicado pela alta taxa de dose requerida em um ensaio como esse. O levantamento dos parâmetros avaliados é feito sobre a análise bidimensional da histomorfometria convencional e também por uma avaliação 3D. Nesse trabalho foram utilizados ratos de 1 a 28 meses de idade, três animais por idade, oito idades diferentes dentre os quais se tem três grupos em separado: um grupo controle, um castrado e outro castrado tratado com um inibidor de reabsorção óssea. Em relação ao processo de envelhecimento, constatou-se que os parâmetros avaliados sofrem uma modificação para mais em sua magnitude, principalmente BV/TV e TbTh. Quanto ao parâmetro TbN esse se manteve constante. Em outras palavras, para ratos entre 25 e 28 meses de idade, a idade induz a um decréscimo de BV/TV e TbTh mas não em TbN. Ao que concerne sobre o processo de castração, apenas depois de três meses de ovariectomia nota-se uma diferença nos valores estruturais ósseos. Quanto à utilização do inibidor de remodelação óssea os resultados obtidos mostram que após um ano de

utilização da droga consegue perceber um retrocesso na perda de massa óssea, ou seja, o inibidor faz com que o processo de perda óssea reduza.

Em seu trabalho, THOMSEN *et al* [19] investigaram a relação entre o aumento da idade e os parâmetros estrutural e morfológico em 32 biópsias da crista ílica para indivíduos dos sexos feminino e masculino. Seus estudos mostraram que existe um declínio linear mais pronunciado entre BV/TV e a mudança de idade, para idades acima de 20 anos. Não existe diferença estatisticamente significativa na relação entre BV/TV e a idade para ambos os sexos. A análise do parâmetro conectividade difere para ambos os sexos: enquanto para o sexo feminino esse parâmetro decresce linearmente com a idade, no masculino independe da idade.

Continuando nessa linha, MOSEKILDE [20] reportou sobre a mudança óssea de acordo com o processo de envelhecimento. Afirmou que o esqueleto humano atinge seu pico de massa óssea e dureza entre 25 e 30 anos. Depois desse intervalo, esses parâmetros não sofrem grandes variações tornando-se praticamente constantes, tanto em homens quanto em mulheres. No processo de remodelamento do osso ocorre uma renovação dos ossos velhos e, com isso, tem-se a reposição das células mortas e a reparação de microfraturas. Porém, por conta do balanço negativo de cada processo de remodelamento, isso tem um custo muito alto: o afinamento das traves ósseas, tanto no osso trabecular quanto na cortical.

Ainda em relação ao acompanhamento da estrutura óssea com o aumento de idade tem-se o trabalho de LIM *et al* [21]. Eles reportaram que as mudanças ocorridas no corpo com relação à idade induzem a um impacto na densidade mineral óssea. Nesse estudo, a massa corporal em homens e mulheres e a gordura corporal em mulheres se mostraram independentes em sua contribuição à densidade mineral óssea. Nas mulheres, conforme ocorre o aumento da idade, tanto a gordura corporal quanto a massa se reduzem. Nos homens, a massa corporal reduz com a idade enquanto a gordura aumenta significativamente. Correlações entre idade e massa corporal atingem um valor

de -0,420 em mulheres enquanto que, para esse mesmo grupo, entre idade e gordura corporal tem-se um coeficiente de -0.146. Nos homens esses valores são -0,478 e -0,022, respectivamente.

THOMSEN *et al* [22], através de imagens tomográficas, fizeram a quantificação dos parâmetros estrutural e morfológico para amostras da crista ilíaca e da 2ª vértebra lombar em 24 homens e 24 mulheres em diferentes idades. Seus estudos revelam um baixo grau de correlação entre os parâmetros quantificados nas diferentes partes anatômicas. Encontram principalmente um decréscimo nos valores de volume trabecular ósseo conforme o aumento da idade para ambos os sítios anatômicos, embora esse decréscimo, na mesma idade, tenha sido mais pronunciado na crista ilíaca. No ilíaco, a conectividade decresce significativamente com o aumento da idade para o sexo feminino, mas não depende da idade para o sexo masculino. Porém não houve uma diferença significativa na relação entre conectividade e aumento de idade, para ambos os sexos, na 2ª vértebra. Essa diferença de resultados mostra que deve ser tomado muito cuidado no momento da escolha da região anatômica para realizar a inspeção desejada.

Segundo DING *et al* [23], um dos fatores primordiais no entendimento de patologias é o conhecimento da microestrutura óssea. Esse trabalho quantificou as mudanças na estrutura porosa de tíbia humana relacionadas com a idade, através de imagens microtomográficas tridimensionais. Para tal foram utilizados 160 cilindros porosos de tíbias de 40 doadores, em uma faixa etária de 16 – 85 anos. Os resultados revelaram que o grau de anisotropia aumentou substancialmente com a idade, enquanto que o volume e a densidade superficial óssea diminuíram. O fator conectividade não possui relação com a mudança de idade. Essa observação sugere um remodelamento mecânico do osso que pode reorientar suas trabéculas para compensar a perda óssea, o que acontece mais fortemente na direção preferencial – paralela ao eixo longitudinal da amostra. Outros dois estudos, com as mesmas amostras, foram desenvolvidos por esses pesquisadores, [24] e [25], revelando que a fração de volume ósseo, o volume trabecular e a superfície óssea

decreceram significativamente com o aumento da idade ocorrendo o contrário para a espessura trabecular (decreceu significativamente com o aumento da idade e essas mudanças tornaram mais expressivas depois dos 80 anos). Já a conectividade não apresentou nenhuma relação com a mesma. Foi notada também uma subestimação da espessura trabecular quando realizada uma avaliação bidimensional em relação às quantificações feitas através do modelo tridimensional.

Como dito anteriormente, a ingestão de álcool contribui para um balanço negativo na remodelação do osso, sendo um importante fator danoso à estrutura óssea é a ingestão de álcool, pois em excesso aumenta a excreção urinária de cálcio, zinco e magnésio, como pode ser comprovado por NYQUIST *et al* [26,27], KANIS *et al* [28] e DYER *et al* [29]. Nesse último trabalho, é mostrado que o magnésio é um dos minerais mais afetados e, sua deficiência está associada ao consumo crônico de álcool, ocorrendo em 30-60 % da população, conforme FLINK [30] e GINDLER *et al* [31]. Tem sido mostrado que o consumo excessivo de etanol pode contribuir positivamente tanto para o desenvolvimento de uma osteopenia (BARAN *et al* [32], CRILLY *et al* [33] e SPENCER *et al* [34]), quanto para um aumento no índice de fraturas, conforme pode ser visualizado em LINDSELL *et al* [35], OPPENHEIM [36], SEEMAN *et al* [37] e WILKINSON *et al* [38]. Em uma população com ingestão de álcool, a má nutrição aparece como um dos fatores primordiais que contribuem para as ocorrências das alterações ósseas (LIEBER *et al* [39,40]). PREEDY *et al* [41] analisam o efeito combinado da ingestão de etanol e a falta de proteína em osso de rato, mostrando que a deficiência de proteína combinada à ingestão de etanol contribui significativamente para o aparecimento da osteopenia, causando um decréscimo da densidade mineral óssea. Um estudo similar foi feito por SANTOLARIA *et al* [42] em humanos, revelando que um decréscimo da densidade mineral óssea em pacientes com consumo de álcool está associado ao fato de que o álcool é tóxico para muitos dos reguladores metabólicos e seu decréscimo altera a função do paratormônio (PTH) e o metabolismo da vitamina D.

Segundo KANIS *et al* [43], a osteoporose é uma doença que acomete os ossos, definida como sendo uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por uma diminuição da massa óssea e deteriorização da microarquitetura com conseqüente aumento da fragilidade óssea e maior susceptibilidade às fraturas. Essa patologia também possui um balanço negativo na remodelação óssea. De acordo com MELLO *et al* [44] e KALU [45], o processo de ovariectomia em ratas tem sido utilizado frequentemente como modelo animal de osteoporose experimental, pois fornece dados semelhantes aos observados no esqueleto adulto pós-menopáusico.

LANE *et al* [46] estudaram seu efeito na estrutura trabecular, através da microtomografia, em ratos submetidos a um modelo de deficiência de massa óssea. Os resultados indicaram que o estrogênio, tanto em altas doses quanto em baixas doses, foi capaz de manter a estrutura trabecular e a massa óssea, na região das tíbias, em ratas com deficiência de estrogênio. Já em BAGI *et al* [47] tem-se a apresentação das diferenças existentes entre ratos e humanos no colo femoral com auxílio da microtomografia. A porcentagem de osso cortical foi muito maior em ratos: 72,5% em ratos enquanto que humanos esse valor decresce para 12,5%. Outro fato apurado diz respeito à distribuição desse tipo de osso na região óssea referida: em ratos, o osso cortical do colo femoral está igualmente distribuído, ao passo que em humanos existe uma diferença considerável entre a parte superior do colo (com uma espessura de cortical da ordem de 0,3 mm) e a inferior (com uma espessura de cortical de aproximadamente 6 mm).

I.2.2 - Fluorescência de Raios X

BARKLA *et al* [48] mostram uma das primeiras aplicações de raios X para a análise elementar a partir da observação dos espectros característicos de raios X. Pode-se dizer que a fluorescência de raios X (XRF) foi introduzida como uma técnica de análise elementar na década de 50. Com o tempo e o desenvolvimento dos detectores semicondutores, GIAUQUE *et al* [49] e HAMMERLE *et al* [50], (estes utilizados para fazer a detecção da radiação fluorescente), foram surgindo aplicações em diversas áreas, como por exemplo, na biologia.

CRISS *et al* [51] desenvolveram um método, utilizando os princípios físicos de produção de fluorescência de raios X para a análise elementar. Esse é o método mais utilizado e difundido em XRF e, é conhecido como o Método dos Parâmetros Fundamentais, que se baseia na solução analítica de equações teóricas que descrevem a dependência da intensidade da radiação fluorescente em termos de parâmetros físicos fundamentais e de parâmetros instrumentais.

Bradley *et al* [52] indicam que XRF rapidamente se tornou uma potente ferramenta de análise para estudar a composição do corpo humano em relação a metais tóxicos (metais pesados, como o chumbo e o ferro), “in vivo”. Nesse estudo revelam que para um tempo de contagem (tempo de irradiação) de 1000 s, o Pb e o Fe podem ser detectados no nível de $10 \mu\text{g (g pele)}^{-1}$, usando uma dose da ordem de poucos m Gy min^{-1} . Seguindo essa análise “in vivo”, TODD *et al* [53] estudaram a variabilidade dos níveis de chumbo em amostra de tibia humanas. Através dessa pesquisa, foi possível observar concentração variando no intervalo de 6 a $13 \mu\text{g}$ de Pb por grama de osso.

PANTERBURG *et al* [54] mostram que a XRF é um método é empregado com bastante eficácia quando se utilizam fontes monocromáticas, podendo ser empregado para fontes de radiação Síncrotron. Nessas condições têm-se

resultados bastante satisfatórios para a determinação da concentração dos elementos presentes nas amostras, a nível traço.

Dentre as diversas técnicas de fluorescência de raios X falar-se-á, em especial, das duas técnicas que foram utilizadas neste trabalho: primeiramente a técnica de fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF) e posteriormente a técnica de microfluorescência de Raios X (μ XRF).

A técnica de EDXRF tem sido largamente utilizada em diversas áreas do conhecimento humano, desde a geológica até a alimentícia, passando pelos campos ambientais e principalmente biológicos, como poderá ser visualizado a seguir.

MORGENSTEIN *et al* [55] utilizaram um equipamento portátil de EDXRF para fazer uma análise geológica de amostras pré-históricas, mais precisamente de cerâmicas pertencentes ao Egito, através dos elementos químicos encontrados em suas superfícies. Com a determinação da composição dessas amostras, auxiliada a dados petrográficos, é possível determinar a fonte desses materiais, assim como sua origem. Nessa mesma linha de aplicação, PLUMMER *et al* [56] aplicam a EDXRF para investigar fósseis ósseos na região do Kênia e, com essa técnica, foi possível encontrar Zr, U, Rb, Rn e Th.

PERRING *et al* [57], aplicaram a técnica de fluorescência de raios X por dispersão em energia para determinar as concentrações de ferro, cobre e zinco em amostras de comida pré-mixadas (comidas com adição de componentes).

ARAÚJO *et al* [58], aplicaram EDXRF para avaliar o nível de poluição dos sedimentos localizados ao longo das águas dos rios em Portugal, determinando suas concentrações elementares em função de sua localização no universo de estudo.

CARVALHO *et al* [59] estudaram tecidos humanos (osso, cabelo, fígado e rins) de 61 indivíduos coletados após sua morte auxiliados por EDXRF. Todas as amostras foram analisadas sem preparação química.

SANCHEZ *et al* [60] reportam um estudo em urina, sangue, estômago e fígado de ratos através EDXRF para a determinação da concentração de arsênio nos tecidos citados. A análise desse elemento em diferentes tecidos e órgãos são importantes para entender o comportamento desse mineral em amostras biológicas e a sua influência na manifestação de diferentes doenças.

Elementos traço são investigados por HOMMA *et al* [61] em rins humanos de adultos e recém nascidos, com fontes de radiação Síncrotron. Os resultados fornecidos mostram que os elementos encontrados (Cu, Se e Zn) estão em maior percentual no córtex renal e em menor quantidade na medula.

KIM *et al* [62] estudaram as concentrações de Pb em osso, utilizando a técnica de XRF por dispersão em energia, utilizando uma fonte de Cd-109. Os resultados mostram que aproximadamente 55% de todos os elementos se localizam no esqueleto humano, e as concentrações encontradas são menores que 10 µg/g.

ÖZDEMİR *et al.* [63,64], mostram um estudo envolvendo a técnica de fluorescência de raios X por dispersão em energia na análise quantitativa e qualitativa em ossos de ratos adultos com administração de paclitaxel – taxol, que é uma droga utilizada para combater tumores sólidos. Nesse trabalho utilizaram-se duas fêmeas adultas: uma com uma alta dose de taxol e a outra com uma baixa dose da droga. Foi utilizada também uma amostra de rata controle. Com uma fonte de excitação de Fe-55 foram encontrados os seguintes elementos: Na, Mg, K e Ca. A concentração relativa de cálcio é maior no animal controle do que nos animais que receberam a administração da droga. Por conta da limitação do número de amostras utilizadas nesse trabalho maiores investigações necessitam ser feitas, porém os autores afirmam que, a princípio, baixas doses de taxol podem ser dadas à pacientes na terapia contra o câncer.

CARVALHO *et al.* [65], reportam a distribuição dos minerais presentes em amostras de ossos humanos da Idade Média pela técnica de reflexão total e de dispersão em energia. As referidas técnicas se mostraram eficazes para a avaliação dos perfis elementares ao longo das amostras ósseas por requererem, entre outras vantagens, uma rápida análise da magnitude das concentrações avaliadas. Os elementos químicos encontrados nas amostras foram: Fe, Co, Mg, S, Zn, Ba and Pb. O estudo dos três primeiros elementos mostra sua fácil penetrabilidade nos ossos através do solo, tendo um enriquecimento maior nas regiões próximas à medula óssea. Em relação ao estrôncio e ao zinco, pode-se dizer que os mesmos não possuem um gradiente de concentração dentro do osso e, aparentemente se mostram constantes em todo o estudo. A presença do bário foi atribuída à contaminação do solo assim como o chumbo, embora esse último elemento tenha apresentado uma alta concentração, tanto na região interna como na externa do osso. Ainda que a alta concentração no interior da amostra demonstre uma contaminação “in vivo”, esse perfil é similar ao do solo.

A μ XRF foi inicialmente utilizada em 1987, por Nichols e Ryon, sendo esses os precursores dessa técnica [66]. Os espectrômetros de μ XRF podem ser divididos em dois grandes grupos: os portáteis, que utilizam tubos de raios X como fontes de excitação, e os que utilizam radiação Síncrotron (SR) [67]. Dentro do primeiro grupo pode ser encontrado o emprego de tubos de raios X da ordem de microns e de detectores com câmara resfriada, não sendo preciso uma grande refrigeração do sistema de XRF [68,69,70]. Em relação ao segundo grupo, têm-se o conhecimento de sua aplicação datada por volta da década de 70 [71], em que se destaca o trabalho envolvendo um feixe de SR monocromático, tendo um anel como local de armazenamento [72]. Desde então, foram várias as aplicações envolvendo a microfluorescência de Raios X por Radiação Síncrotron (μ XRF-SR) [73 - 78]. Dentre elas pode ser destacada a que envolve amostras biológicas, tal como osso.

HUANG *et al* [79] estudaram, através da μ XRF-SR, amostras cancerígenas e não cancerígenas de fígado e de osso. Com essa técnica, esses pesquisadores foram capazes de identificar diferenças nas concentrações dos elementos presentes nas amostras analisadas, as quais se mostraram maiores nos materiais cancerígenos.

GERHARDSSON *et al* [80] estudaram a concentração de chumbo em ossos corticais e esponjosos de trabalhadores expostos a esse elemento e de pessoas estão expostas a esse mineral (considerado com sendo um grupo de controle). Os estudos mostram que o primeiro grupo possui uma maior concentração de chumbo (o que já era previsto, uma vez que essas pessoas foram rotineiramente expostas a esse mineral), especialmente nos ossos do dedo, seguidos das vértebras e da crista ilíaca. O conhecimento das concentrações ósseas de chumbo é um importante indicativo na datação da exposição de um determinado indivíduo. Nessa mesma linha de pesquisa, BÁRÁNY *et al* [81,82] além de terem também estudado o aparecimento de chumbo em ossos, investigaram amostras de sangue e urina. Seus estudos revelaram que a concentração de chumbo nos ossos cresce significativamente durante a vida útil do trabalhador num fator de 4,2 μ g/g/ano.

JANEZ *et al* [83] estudaram a concentração dos elementos presentes em amostras de fósseis ósseos e compararam seus resultados com os encontrados na literatura provenientes da análise de outras técnicas, tais como ativação neutrônica e espectroscopia de massa. Uma das grandes vantagens da aplicação da μ XRF-SR em relação àquelas mencionadas, é a forma não destrutiva de análise e o baixo limite de detecção, da ordem de poucos μ g/g, obtendo valores de concentrações abaixo de 10 μ g/g. Os resultados indicaram que os elementos encontrados estão distribuídos heterogeneamente e a relativa abundância dos mesmos pode prover informações importantes durante o processo de fossilização.

Além da informação sobre a concentração dos elementos químicos presentes na superfície dos materiais que se desejam investigar, a técnica de

μ XRF-SR pode fornecer também, imagens bidimensionais mostrando como esses elementos estão distribuídos na amostra. Um dos primeiros estudos que se tem conhecimento nesse âmbito é apresentado por HOMMA *et al* [84]. Nesse trabalho foi investigada a distribuição de elementos como Cu, Se e Zn em amostras de rins humanos. Os resultados mostraram que todos os elementos se concentram mais fortemente no córtex renal do que na medula e, as imagens que foram obtidas se mostraram de acordo com as adquiridas pela técnica de ICP-AES (absorção atômica), investigada anteriormente.

FUKUMOTO *et al* [85] também utilizaram a referida técnica para produzir mapas elementares, mas agora em plantas, se mostrando uma potente técnica para monitorar, em tempo real, a distribuição elementar. Uma característica diferente utilizada nesse trabalho foi a implementação de uma óptica capilar na instrumentação do sistema. Segundo ATTAELMANAN *et al* [86] a utilização de tal instrumento foi introduzida com o objetivo de gerar micro feixes com alta intensidade e guiar o feixe de radiação até a amostra, como uma fibra óptica. Tal instrumento permite um aumento na resolução espacial das imagens adquiridas no mapeamento bidimensional das amostras analisadas.

CAPÍTULO II

II. Considerações Teóricas

II. 1. Raios X - Uma breve história

Como já foi citado anteriormente, o físico alemão Wilhelm Roentgen descobriu um tipo de **raio** produzido por um feixe de raios catódicos¹, que incidia sobre a superfície de vidro do tubo onde se produziam descargas através de um gás [87]. Ele estudava a emissão de luz ultravioleta de um tubo de raios catódicos dirigindo a luz para cristais de platinocianeto de bário, que fluorescem sob luz ultravioleta, ou seja, os cristais parecem absorver a luz ultravioleta e então, devolvê-la emitindo luz própria.

Depois de várias investigações sobre o assunto, ele dirigiu os **raios** para chapas fotográficas sensíveis e conseguiu registrar a imagem dos ossos da mão de sua esposa, porque os mesmos atravessaram a substância tenra da mão com mais facilidade de que atravessaram os ossos. Essa foi a primeira radiografia já feita, e viria a ser uma das mais famosas imagens do mundo científico [87]. Ele os denominou de "**raios X**". Esse pesquisador descobriu que esses raios podem atravessar materiais sólidos, não mostram sofrer reflexão no vidro nem são desviados por campos magnéticos e, ionizar o ar. Hoje, sabe-se que são ondas eletromagnéticas de alta frequência (pequeno comprimento de onda), normalmente emitida durante a relaxação dos elétrons orbitais mais internos dos átomos [88].

¹ Em meados do século XIX, os físicos começaram a estudar o efeito de correntes elétricas em traços de gás deixados em tubos de vidro de onde o ar tinha sido quase completamente evacuado - o que foi então possível graças à invenção da bomba de vácuo. Para esses experimentos, a corrente era obrigada a fluir entre uma placa positivamente carregada numa extremidade do tubo (o ânodo) e uma placa negativamente carregada na outra extremidade (o

II. 2. Processos de Interação da Radiação com a matéria

Enquanto uma corrente de elétrons numa lâmpada fluorescente excita os elétrons mais externos dos átomos, produzindo fótons de luz ultravioleta e de luz visível, um feixe mais energético de elétrons incidindo sobre uma superfície sólida excita os elétrons mais internos do material, produzindo fótons com freqüências mais altas de radiação X - fenômeno chamado de **fluorescência** [90]. Este é o espectro discreto (característico de cada material, uma vez que cada elemento possui níveis de energia específicos) de raios X. Há também o espectro contínuo de raios X, conhecido como "bremsstrahlung", gerado pela forte desaceleração de elétrons arremessados contra uma placa eletricamente carregada. A figura II.1 mostra o espectro combinado [89].

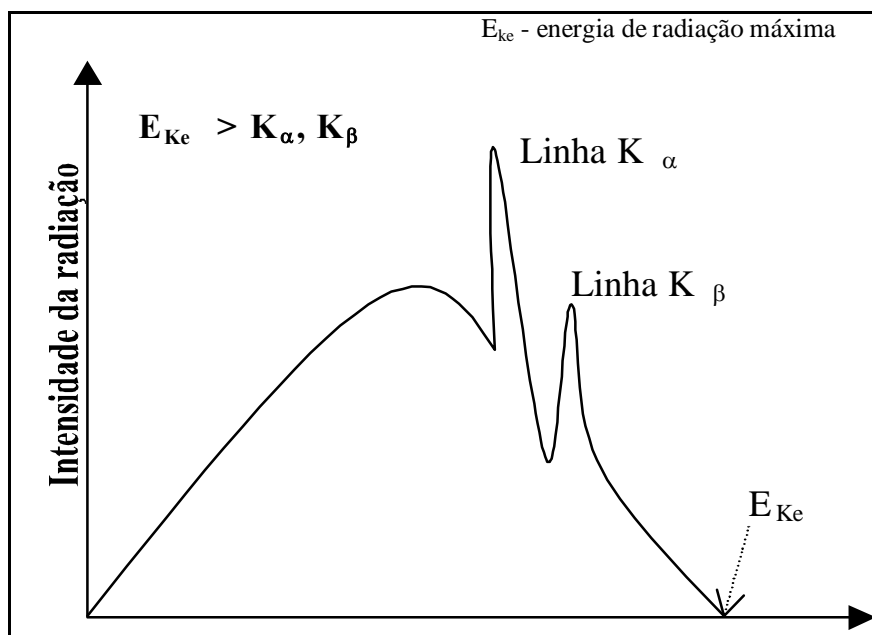


FIGURA II.1 - ESPECTRO COMBINADO DE RAIOS X.

Lacunas situadas na camada (a mais interna) completadas por elétrons realocados da camada eletrônica seguinte (camada L) dão origem à chamada

cátodo). Isso resultava num feixe de raios negativamente carregados, fluindo a partir do cátodo. De modo bem lógico, eles foram chamados de RAIOS CATÓDICOS.

"linha K_{α} " (figura II.2). Caso o elétron, no entanto, seja proveniente da camada eletrônica que vem na seqüência (camada M), a diferença de energia entre as camadas K e M será maior, assim, também sendo a energia do fóton emitido. Esse rearranjo menos freqüente (tipicamente 10% dos casos de preenchimento de uma lacuna na camada K) dará origem à linha característica chamada K_{β} .

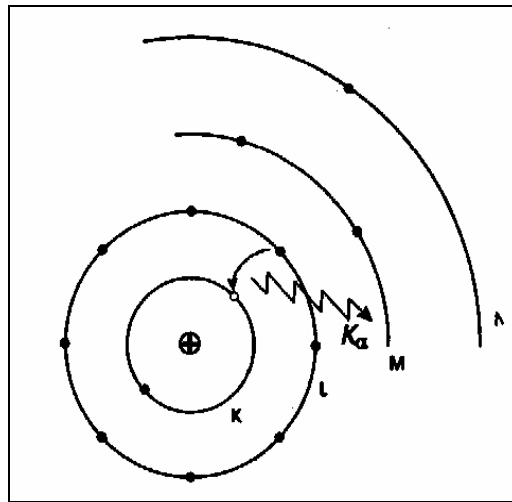


FIGURA II.2 - PROCESSO DE GERAÇÃO DA LINHA CARACTERÍSTICA K_{α}

Os raios X podem interagir com a matéria, principalmente por três processos: o fotoelétrico, o Compton e a produção de pares.

O efeito fotoelétrico (figura II.3) é predominante para baixas energias ($<1\text{MeV}$) e a probabilidade de ocorrência desse efeito aumenta com a quinta potência de Z [89]. Acontece quando a energia incidente do fóton é totalmente transferida a um único elétron orbital. Esse, por sua vez, é expelido, havendo o aparecimento de uma vacância no átomo, representando uma instabilidade atômica. Para o átomo se tornar estável novamente, essa vacância será preenchida por outro elétron situado na camada atômica mais externa. Com isso, ocorrerá a emissão de raios X característicos ou a emissão de elétrons de Auger² (figura II. 4). Dentre todas as formas de interação dos raios X com a matéria, esta é a que mais transfere energia ao material.

² Num átomo excitado, o excesso de energia, ao invés de ser liberado pela emissão de raios X característicos pode ser transferido diretamente para um elétron de uma camada mais externa. O processo pode ser entendido como se, ao ser emitido, o raio X característico virtual colidir com elétrons do próprio elemento, retirando-os por efeito fotoelétrico. Esses elétrons são

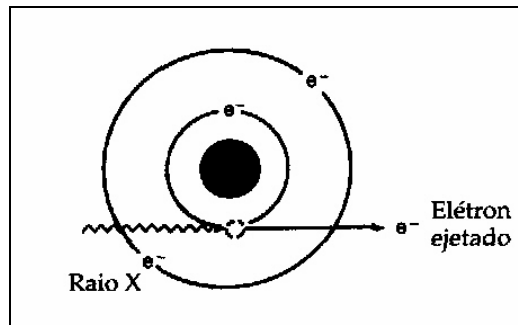


FIGURA II.3 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO EFEITO FOTOELÉTRICO.

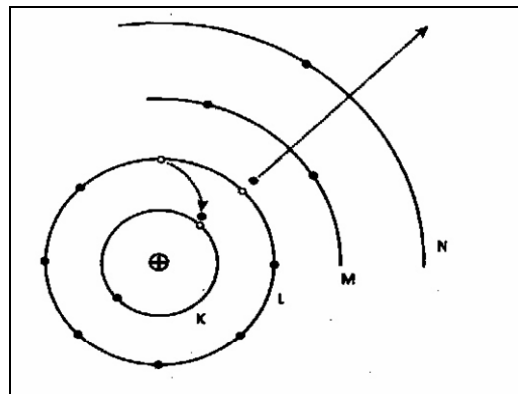


FIGURA II.4 - PROCESSO DE EMISSÃO DE UM ELÉTRON AUGER.

O efeito Compton (figura II. 5), ocorre com maior probabilidade para energias entre 1 e 5 MeV [89]. Nesse caso, a radiação incidente transfere para os átomos - alvo parte de sua energia, a fim de promover o deslocamento de elétrons que estão situados, principalmente, nos orbitais mais periféricos da eletrosfera. A energia não transferida deixa o átomo com um fóton emergente, cuja energia é menor do que aquela do fóton incidente. Assim, nesse tipo de interação, um fóton continua a se propagar depois de interagir com o meio, seguindo, no entanto, uma direção diferente daquela que possuía antes da interação. A energia do fóton incidente não é usada apenas para o deslocamento do elétron (o que acontece no efeito fotoelétrico), mas também

denominados de elétrons de Auger. Da mesma forma que os raios X característicos, esses elétrons são dependentes dos níveis de energia da eletrosfera e, portanto seu espectro de distribuição é discreto.

para fornece-lhe energia cinética para que abandone o átomo a que pertencia. A quantidade de energia que permanece no fóton emergente depende da energia inicial incidente e do ângulo com que o fóton emergente se desvia da trajetória do fóton incidente (ângulo de desvio). Quanto maior for esse ângulo, maior será a energia transferida para o elétron, logo menos energético será o fóton emergente (figura 6). A probabilidade de ocorrência desse efeito depende da densidade do absorvedor e do número de elétrons por grama de material. Contudo, não depende do número atômico do elemento-alvo. Quanto maior a energia do fóton incidente no material, menor será a probabilidade de ocorrência desse efeito [90].

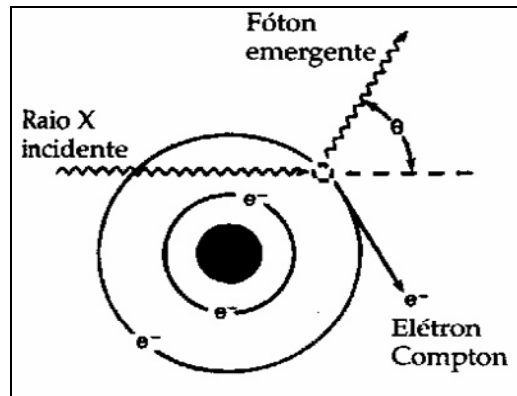


FIGURA II.5 - EFEITO COMPTON

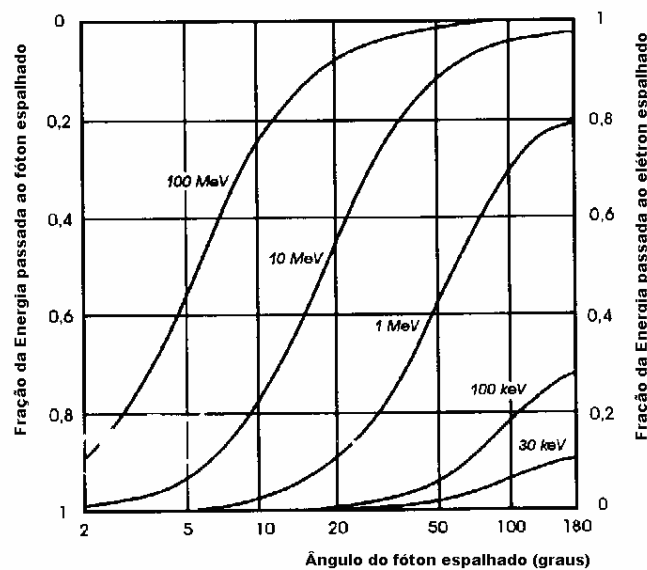


FIGURA II.6 - ÂNGULO DE ESPALHAMENTO COMPTON PARA O FÓTON E PARA O ELÉTRON ESPALHADO, PARA DIFERENTES ENERGIAS.

Na produção de pares (figura II. 7), um fóton de alta energia (>5 MeV), ao se aproximar de um núcleo atômico (quanto maior for Z , maior é a probabilidade de interação) [91], é transformado em duas partículas com massas semelhantes à massa do elétron. Uma delas, o pósitron (e^+), transporta carga positiva e a outra, o nêgatron (e^-), transporta carga negativa. Essas partículas se afastam uma da outra com grande velocidade, com isso elas são impedidas de se recombinar (sofrer aniquilação). A massa do elétron e do pósitron é de 0,51 MeV. Assim, esse tipo de interação não pode existir com fótons de energia menor do que 1,02 MeV. Este mecanismo de interação não ocorre na faixa de energias usadas no radiodiagnóstico.

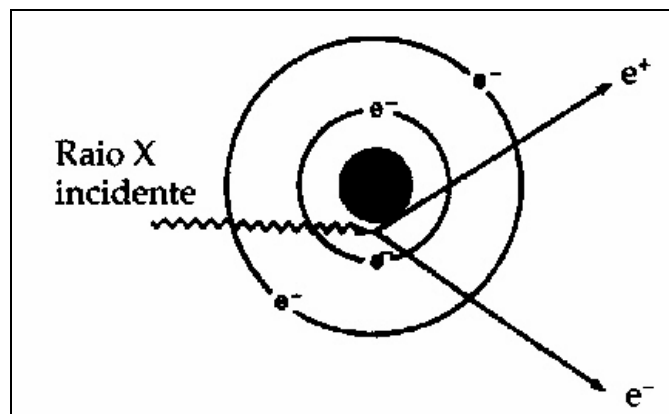


FIGURA II.7 - PRODUÇÃO DE PARES

A predominância dos diferentes fenômenos de interação da radiação com a matéria, conforme a faixa de energia dos fótons incidentes pode ser mostrada através dos coeficientes de atenuação total e de absorção dos fótons em um determinado meio, como mostra a figura II. 8 e a tabela II.1 [92]

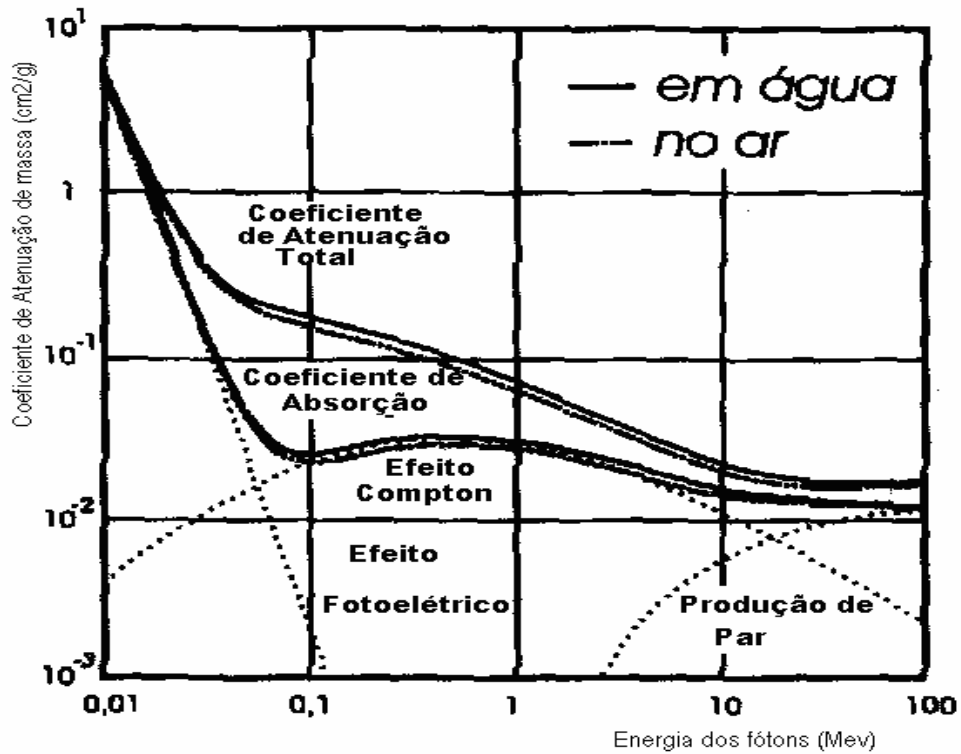


FIGURA II.8 - COEFICIENTES DE ATENUAÇÃO TOTAL E ABSORÇÃO PARA A ÁGUA E PARA O AR. AMBAS AS CURVAS SÃO MUITO SEMELHANTES DEVIDO À PROXIMIDADE DOS NÚMEROS ATÔMICOS EFETIVOS DE AMBOS OS MEIOS (7,5 E 7,8, RESPECTIVAMENTE).

TABELA II. 1 - PREDOMINÂNCIA DE CADA EFEITO DE ACORDO COM A FAIXA ENERGÉTICA

<i>Faixa de energia dos fótons</i>	<i>Processo de atenuação dominante (em tecido humano)</i>
Até 50 keV	Fotoelétrico
60 - 90 keV	Fotoelétrico + Compton
200 a 2 MeV	Compton
5 MeV a 10 MeV	Compton + Produção de Par

Acima de 50 MeV

Produção de par

Como explicitado anteriormente, à medida que um feixe de raios X atravessa a matéria, ocorre a atenuação de sua intensidade. Essa atenuação se deve aos fenômenos de absorção e de espalhamento da radiação incidente e é calculada segundo a Lei da Atenuação Exponencial [93]:

$$I(x) = I_0 \exp \left[- \int_L \mu(x, y) dl \right] \quad (I).$$

Para feixes monoenergéticos, tem-se:

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

Onde:

I(x) a intensidade da radiação depois de passar pelo material de espessura **x** (expresso geralmente em metros), **I₀** a intensidade antes de atravessar o material, **μ** o coeficiente de atenuação linear (expresso em m⁻¹), **L** é o trajeto da radiação através do corpo de prova e **dl** o incremento da distância ao longo de **L**.

Portanto, o feixe de radiação é atenuado de forma exponencial com a espessura de material, como mostra a figura II. 9.

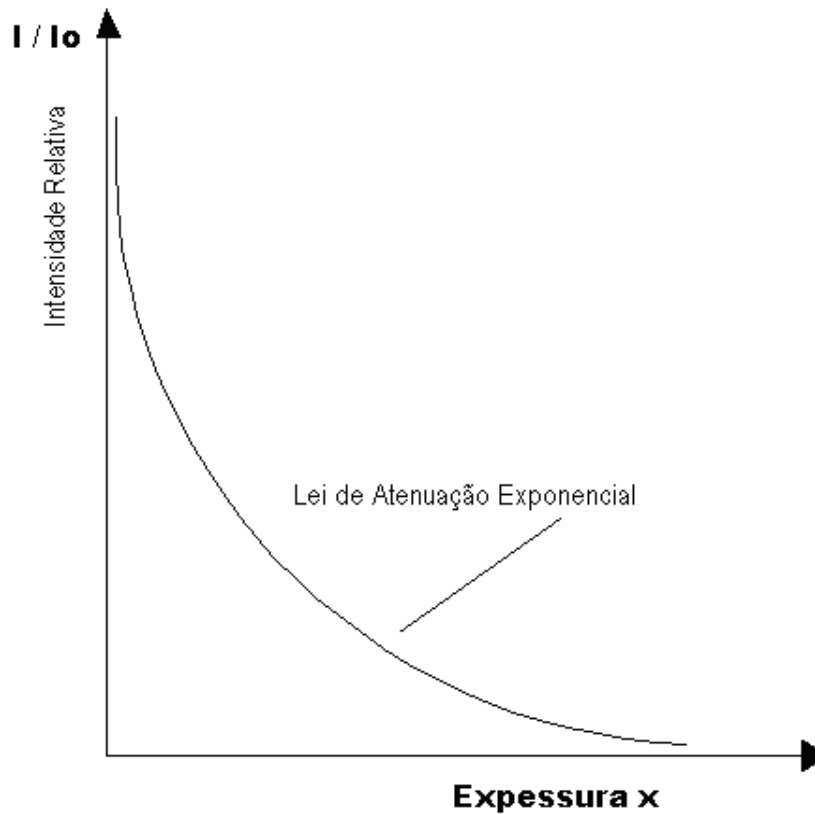


FIGURA II.9 - ESQUEMA DA ATENUAÇÃO DOS RAIOS X

Com isso, quanto maior for o coeficiente de atenuação linear maior será a atenuação. Todavia, como a interação da radiação com a matéria tem como resultado a absorção, o coeficiente μ depende do número atômico do material, da densidade do material e da energia da radiação incidente. Essas duas últimas grandezas estão relacionadas segundo a equação III [92];

$$\mu = \mu_m \cdot \rho \quad (III).$$

Onde:

μ_m é o coeficiente de atenuação e massa, expressos em m^2/kg , e ρ é a densidade do material, expressos em kg/m^3 .

II. 3. Registro da Radiação

A medição da radiação pode ser feita com filmes sensíveis à radiação ou por produção de imagem visível em tela fluoroscópica de um intensificador de imagem via detector (aparelhos sensíveis à radiação) [91].

As emulsões fotográficas são constituídas de grãos de haletos de prata (normalmente brometos) dispersos em uma gelatina. Cada grão possui aproximadamente 10^{10} átomos de Ag⁺. A presença de prata metálica remanescente após o processo de revelação está relacionada à quantidade de radiação a que foi submetida à emulsão.

O princípio básico do registro da radiação por meio de filmes consiste no seguinte:

- 1) Exposição: quando a radiação incide no filme, ocorre a interação da mesma com os grãos de brometo de prata (presentes na emulsão do material de base do filme) através do processo de ionização;
- 2) Revelação: no processo de ionização os grãos são alterados e quando passados por um processo químico, o bromo dos grãos é eliminado restando apenas a prata provocando o enegrecimento óptico da camada da emulsão;
- 3) Fixação: os grãos de brometo de prata que não foram ionizados são eliminados por um processo químico.

É importante salientar que o tipo de filme e o seu tratamento devem ser feitos conforme as recomendações do fabricante do filme e dos reagentes químicos.

O detector de radiação é um dispositivo que, quando colocado em um meio onde há um campo de radiação, é capaz de indicar a sua presença. Normalmente, um detector é constituído de um elemento ou material sensível à radiação e um sistema que transforma os efeitos das radiações com a matéria em um valor relacionado a uma grandeza de medição desta radiação [92].

A eficiência de um detector é basicamente a capacidade do mesmo em registrar a radiação e associa-se normalmente, ao tipo e energia da mesma (da

radiação), e é influenciada pela distância do emissor e do tipo de feixe (colimado ou radial).

Alguns fatores definem a escolha de um detector, e são eles [89]

- 1) Tipo de radiação: uma vez que as radiações interagem de forma diferente com a matéria, a escolha do detector depende do tipo de radiação que ele vai detectar. Normalmente, um tipo de detector que mede um tipo de radiação pode ser totalmente inadequado para medir outro tipo;
- 2) Tipo de informação desejada: a escolha depende também da finalidade que se deseja, ou seja, informações sobre o número de contagens ou energia da radiação detectada. Em outros casos se busca a relação com a dose absorvida ou distribuição de energia;
- 3) Características operacionais e custo: incluem facilidade de operação e disponibilidade de manutenção;
- 4) Intervalo de tempo de interesse: medição imediata ou não. Na primeira tem-se, por exemplo, a avaliação da radiação em um local antes de realizar uma ação qualquer. No segundo caso tem-se o desejo de medir a radiação acumulada durante um período o qual um trabalhador foi exposto;
- 5) Condição de trabalho do detector: para um trabalho de campo o detector deve possuir condições de portabilidade e autonomia. Já para ambientes fechados, como num laboratório, por exemplo, estas condições não são essenciais.

Na mediação da radiação por meio de detectores (de fluorescência ou de cintilação, por exemplo), os raios X podem ser convertidos em luz com o intuito de obter uma imagem visível ou podem ser convertidos em sinais de corrente ou tensão para a representação da imagem por via eletrônica [96]. Para que a conversão aconteça são necessários materiais específicos que possibilitem tal processo. Nos detectores de fluorescência utiliza-se material fluorescente tal como ZnS e CaWO_4 . Já nos detectores de cintilação utilizam-se materiais translúcidos (cristais), principalmente iodetos alcalinos tais como

Nal, Csl ou Lil. As figuras II.10 e II.11 ilustram os processos que ocorrem nos dois detectores referidos. De acordo com o processo de funcionamento dos detectores, os sinais elétricos são levados a um conversor de sinal que os transforma numa forma televisiva. A imagem da câmara de vídeo é levada até um conversor analógico digital, a qual é convertida em uma imagem digital.

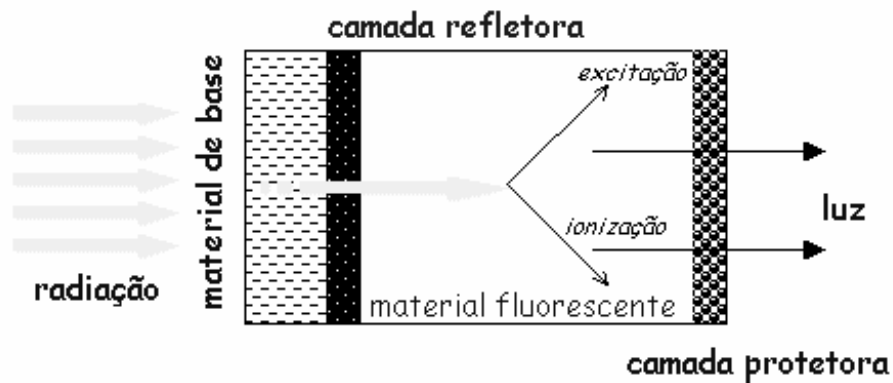


FIGURA II.10 – PROCESSO DE MEDIÇÃO NO DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA.

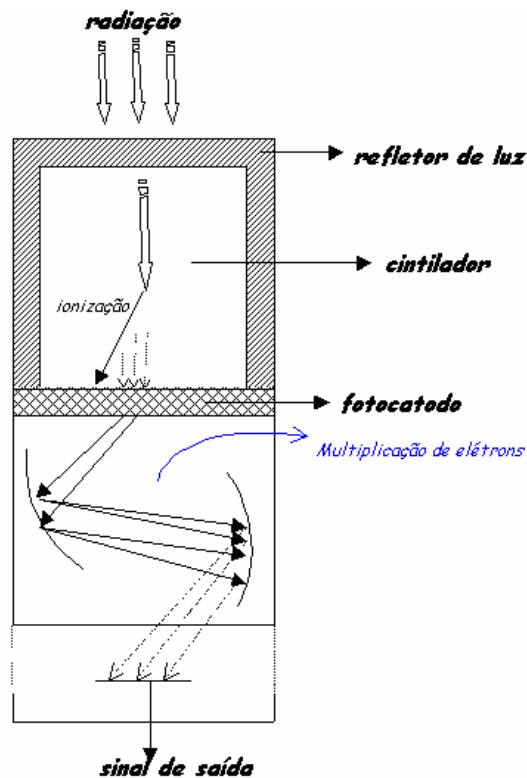


FIGURA II.11 – PROCESSO DE REGISTRO NO DETECTOR DE CINTILAÇÃO.

O intensificador de imagem é um dispositivo comumente utilizado para adquirir imagens em tempo real [93,94]. Existem quatro componentes principais: janela de vácuo, uma camada de entrada que converte os raios X em elétrons, lentes eletromagnéticas para a focalização dos elétrons e, uma janela de saída de fósforo cujo objetivo é converter os elétrons acelerados em luz visível, como pode ser visualizado na figura II. 12.

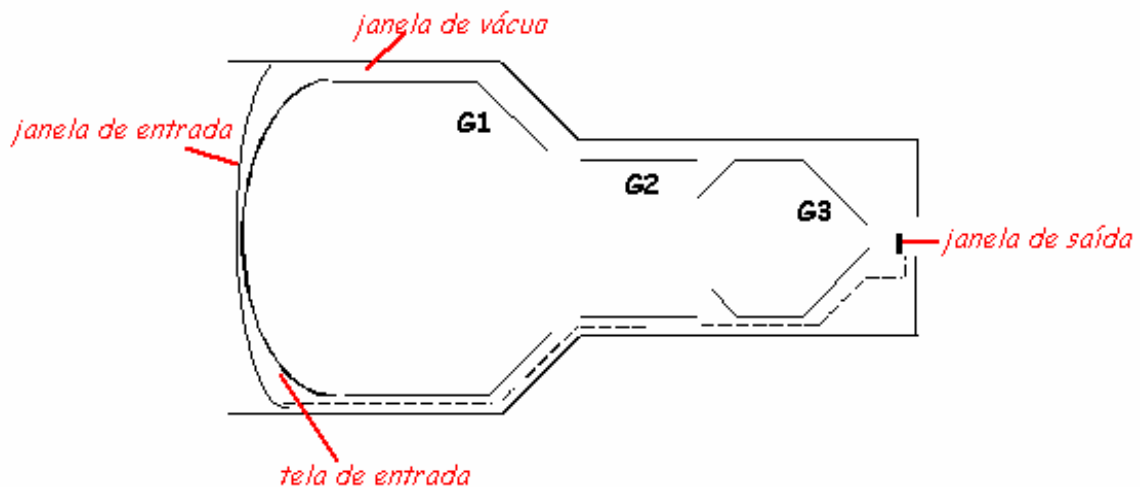


FIGURA II.12 – ESTRUTURA INTERNA DE UM INTENSIFICADOR DE IMAGEM.

A janela de entrada de um intensificador de imagem usual possui algumas camadas, como pode ser visualizado na figura II. 13. A primeira consiste de uma camada fina de Al (aproximadamente 1mm de espessura) que faz parte da janela de vácuo, a segunda é um suporte de Al, forte o bastante para a tolerar a camada de fósforo e a do fotocátodo, mas fina o suficiente para que os raios X passem através da mesma. Depois de passarem pela janela de entrada de Al e pelo substrato de Al, os raios X “batem” na camada de fósforo, que possui a função de absorver os raios X e converter suas energias em luz visível. A maioria dos intensificadores de imagem utilizam CsI na janela de fósforo e o fotocátodo é uma camada fina de antimônio e de metais alcalinos (como por exemplo, Sb_2S_3) que emitem elétrons.

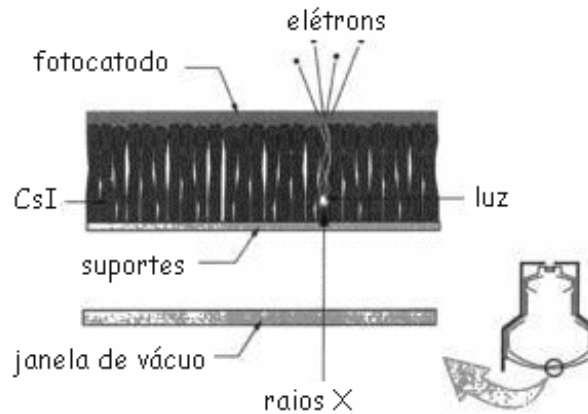


FIGURA II.13 – JANELA DE ENTRADA – UMA AMPLIFICAÇÃO.

Uma vez que os raios X são convertidos em luz visível e então em elétrons na janela de entrada, os elétrons são acelerados por um campo elétrico e então focalizados por lentes eletrônicas.

A janela de saída (figura II. 14) geralmente é feita de ZnCdS dopado com Ag. Os elétrons “batem” na janela de fósforo, causando a emissão de luz.

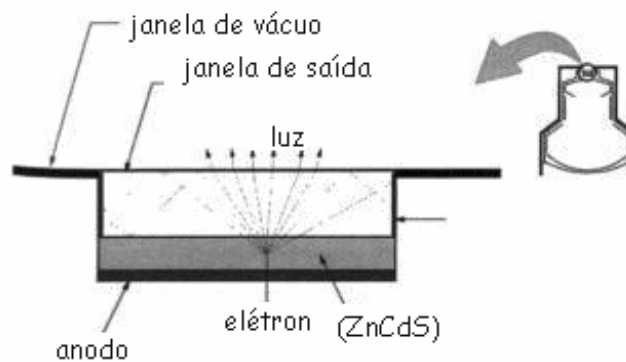


FIGURA II.14 – JANELA DE SAÍDA - UMA AMPLIFICAÇÃO.

II. 4. O Processo tomográfico

Na radiografia convencional, é feita uma representação bidimensional de um "defeito" tridimensional de certo material (figura II. 15) [95,96]. Não podem ser obtidas informações quanto a sua forma tridimensional, o que é muito importante para a avaliação do "defeito" existente.

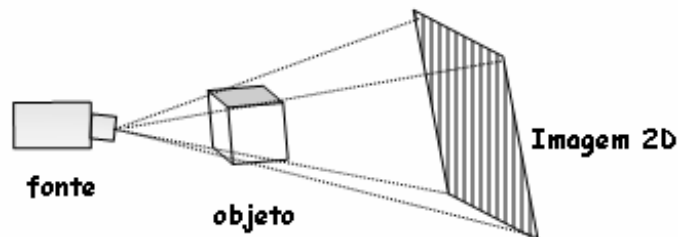


FIGURA II.15 - PROJEÇÃO BIDIMENSIONAL

A tomografia é uma técnica utilizada na obtenção de imagens de seções transversais de um dado material [100]. Com ela é possível obter informações sobre o posicionamento e a forma do "defeito" a partir de várias direções. Para isso, o corpo de prova é rotacionado segundo a direção de radiação e é medida a atenuação dessa radiação nas diferentes fatias do material, podendo ser calculada segundo a equação (IV). Na prática usam-se, freqüentemente, feixes polienergéticos: tubos de raios X que emitem um espectro contínuo. E nesta condição tem-se [97]:

$$I = \int_0^{E_{MAX}} I_0 \exp \left[- \int_L \mu(x,y,E) dl \right] dE \quad (IV).$$

Neste caso, ocorrerá um deslocamento espectral devido à absorção preferencial dos fótons de baixa energia que penetram no corpo de prova: esse efeito é chamado de endurecimento de feixe.

Esse efeito pode ser minimizado pela colocação de um filtro de radiação de metal na janela de saída dos raios X. O motivo da filtragem é reduzir a quantidade de raios X de baixa energia e, com isto, aumentar a quantidade de energia mais alta [98]. A filtragem é especialmente necessária quando o corpo de prova apresenta grandes diferenças de espessura. Os materiais típicos para os filtros são o cobre, o latão e o chumbo.

Para fins de simplificação da teoria aqui explicitada, desprezar-se-á o efeito descrito acima e, em situações reais, pode-se reescrever a equação IV da seguinte forma:

$$\ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \ln\left[\exp\left(\int_L \mu(x,y)dl\right)\right] \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \int_L \mu(x,y)dl = P(x,y) \quad (V).$$

O termo $\ln\left(\frac{I_0}{I}\right)$ é chamado de raio-soma e, representa uma soma de coeficientes de atenuação ao longo do caminho do feixe. Se há um conjunto de raios, em um dado ângulo, no plano paralelo ao feixe de radiação, tem-se o termo projeção. Cada projeção (figura II.16) é adquirida com o objeto (ou o sistema fonte-detector) girado de certo ângulo em relação à posição original, de modo que, se obtém uma projeção para cada ângulo. Uma vez obtido o conjunto das projeções do sistema CT, dá-se então a necessidade de sua reconstrução. Antes do processo de reconstrução tem-se a execução de um sinograma. Sinograma é uma imagem dos dados brutos adquiridos na tomografia, isto é, é uma imagem contendo os dados projetados que correspondem a uma imagem transaxial do objeto. (figura II.17) [99]. Aqui, os

raios são plotados horizontalmente e a visualização é feita no eixo vertical. O sinograma ilustrado corresponde a um objeto circular contendo quatro furos. Durante a rotação de 360° na CT, a posição do raio correspondente ao objeto inspecionado varia sinoidalmente como uma função do ângulo de visão.

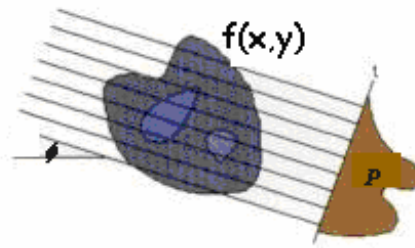


FIGURA II.16 - ILUSTRAÇÃO DE UMA PROJEÇÃO ATRAVÉS DE UM OBJETO EM UM ÂNGULO DE VISÃO ϕ FORMANDO UMA FUNÇÃO P.

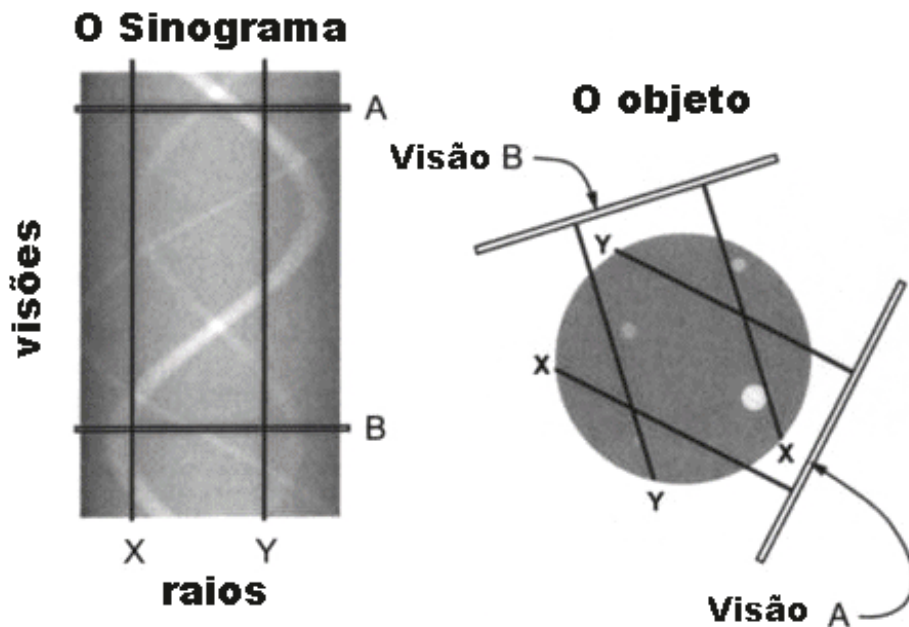


FIGURA II.17 - ILUSTRAÇÃO DE UM SINOGRAMA.

II. 4.1 – A Reconstrução

O processo de reconstrução constitui num caminho matemático que envolve a obtenção de $\mu(x,y)$ a partir das medidas dos raios-soma. Dessa forma, a CT fornece uma imagem de uma fatia do material inspecionado na forma dos seus coeficientes de atenuação. A grande quantidade de dados medidos que são necessários para as diversas fatias de corte e, a complexidade dos algoritmos de reconstrução para a confecção das imagens, faz com que haja uma necessidade de computadores rápidos de alta capacidade.

Os métodos utilizados para tal fim estão agrupados basicamente em duas classes, dadas a seguir, onde em cada delas têm-se vários tipos de algoritmos [100]:

- i) Métodos Diretos ou Analíticos:
 - Retroprojeção Filtrada ou Convolução;
 - Reconstrução Direta de Fourier;
 - Imagem Direta de Fourier.

- ii) Métodos Iterativos ou Algébricos:
 - Reconstrução Algébrica;
 - Reconstrução Simultânea;
 - Reconstrução por Mínimos quadrados.

A escolha de qual método dever-se-á utilizar depende tanto das limitações do sistema de aquisição de dados quanto do tempo que se possui para o processamento dos mesmos [101].

Foram desenvolvidos vários algoritmos de reconstrução que permitem obter uma imagem. Dentre eles, o utilizado nesse trabalho é o algoritmo baseado no primeiro método explicitado acima, com o algoritmo de retroprojeção filtrada [102]. Neste princípio, as imagens de CT colhidas no processo de aquisição são revertidas e, depois são processadas para criarem “slices” 2D ao longo de quaisquer uns dos três planos ortogonais.

O algoritmo de reconstrução 3D por retroprojeção filtrada consiste de três passos básicos: rescalonamento, filtragem e retroprojeção das projeções, apresentadas a seguir [103]:

- Reescalonamento: esta etapa está contida dentro do próprio modelo matemático da equação de reconstrução. O efeito do reescalonamento é apenas um ajuste das dimensões no espaço de reconstrução;

- Filtragem: nesta etapa tem-se a operação de filtragem, representada por uma convolução da função projeção com a função filtro, dados por:

$$P_{\phi}'(r) = P_{\phi}(r) * f(r) \quad (VI).$$

- Retroprojeção: nesta parte do processo tem-se que as projeções já filtradas são agora retroprojetadas no plano da imagem, ocorrendo, portanto a correção nos valores de $\mu(x,y)$, mencionada anteriormente.

II. 4.2 – A Imagem

Uma vez já reconstruída, a imagem é mostrada em forma de uma matriz digital $N \times M$ "pixels"³, onde N representa o número de "pixels" existentes na vertical e M os da horizontal (figura II.18). Para cada valor do "pixel" designa-se um valor de cinza que é proporcional a $\mu(x,y)$, ponto a ponto. Assim, tem-se que a região mais densa aparece mais escura e conseqüentemente à região que é menos densa aparece menos escura, ou seja, quanto mais denso mais escuro. Como a maioria dos monitores apresenta 256 níveis de cinza com um byte (1 byte= 8 bits e $2^8=256$ - o máximo para tais), a escala é realizada da seguinte forma: valor 0 para o preto, e 255 para o branco e, os valores que são intermediários a estes equivalem aos níveis de cinza propriamente dito [104]. Ao proceder à digitalização de uma imagem de níveis de cinza, cada um dos pontos da imagem-matriz tem que se colocar em dependência de um valor de níveis de cinza. O número de pontos da imagem por matriz é importante para a resolução local da imagem. São usados números duais devido ao aproveitamento da memória, de forma que os tamanhos da matriz são utilizados em forma de (512 x 512 ou 1024 x 1024 pontos da imagem, etc.).

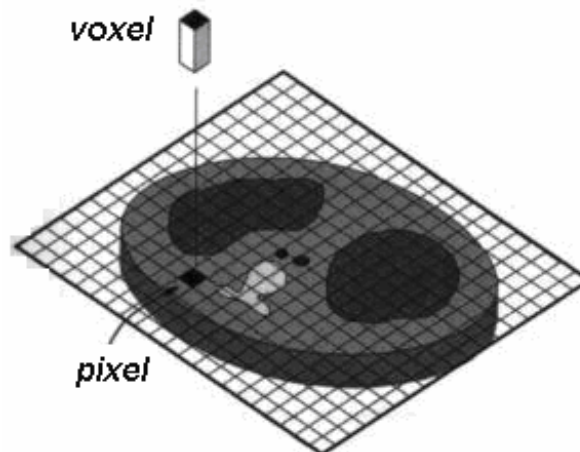


FIGURA II.18 - REPRESENTAÇÃO DE "PIXEL" E "VOXEL". "PIXEL" É A REPRESENTAÇÃO BÁSICA DE UM ELEMENTO BIDIMENSIONAL EM UMA IMAGEM DIGITAL. VOXEL É A REPRESENTAÇÃO 3D, COM A TERCEIRA DIMENSÃO REPRESENTANDO A ESPESSURA DO "SLICE".

³ Pixel – de picture element.

Uma outra representação apropriada para a representação de uma imagem é o perfil do nível de cinza, que mostra o perfil do nível de cinza ao longo de uma reta escolhida ao acaso da imagem-matriz (figura II.19).

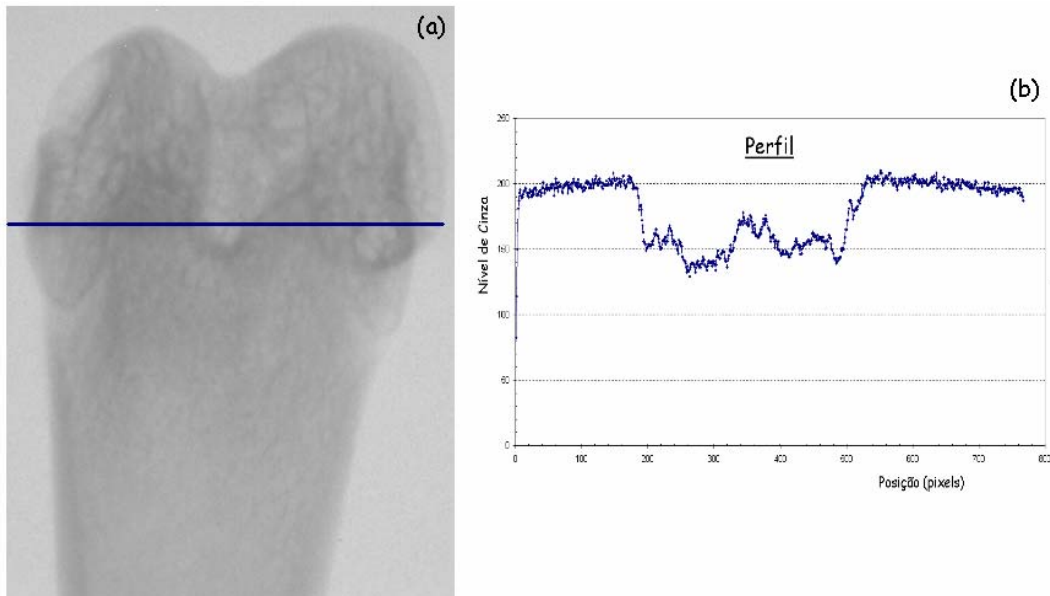


FIGURA II. 19 – (A) IMAGEM-MATRIZ (RADIOGRAFIA DE UM DENTE REGISTRADA COM UM APARELHO MICROFOCUS A 40 kV E 0,2 mA; IMAGEM EM TONS DE CINZA; (B) PERFIL DO NÍVEL DE CINZA.

Em princípio há uma diferença entre a tomografia bidimensional (CT-2D) e a tridimensional (CT-3D), como pode ser visualizada nas figuras a seguir.

Na CT-2D (figura II. 20) é medido o nível de corte transversal, ou seja, o resultado da medição é uma imagem do corte transversal, na qual cada ponto da imagem representa um elemento de volume do objeto. Já na CT-3D (figura II.21), são ao mesmo tempo registradas várias camadas de corte aproveitando-se o cone completo de radiação [89].

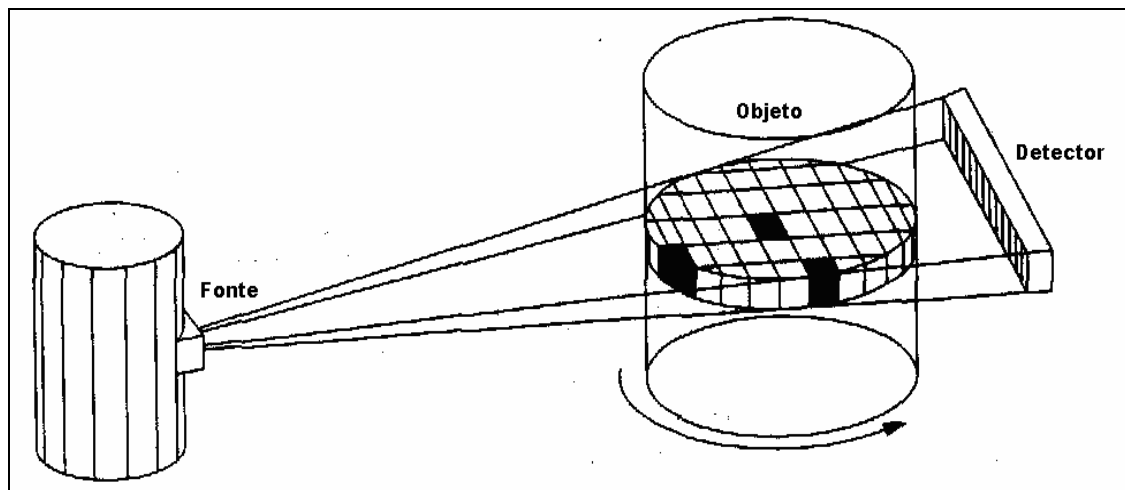


FIGURA II.20 - TOMOGRAFIA 2D

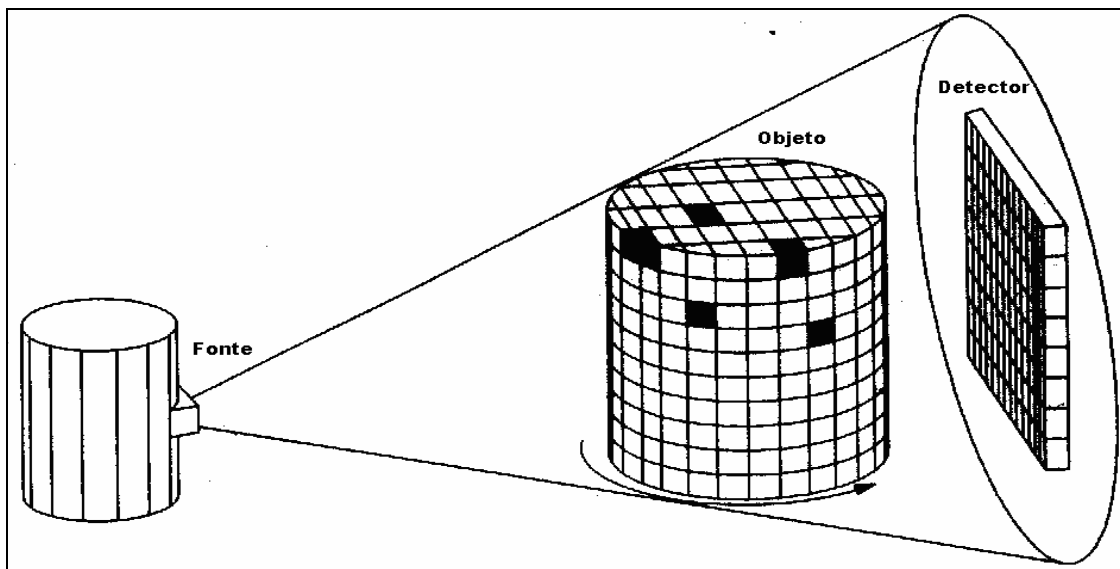


FIGURA II.21 - TOMOGRAFIA 3D

II. 4.3 – A Micro CT

A técnica de Microtomografia Computadorizada (μ CT) possui o mesmo embasamento explicitado na discussão dos princípios de CT (item II. 4), tendo sido especialmente desenvolvida para a inspeção de pequenas estruturas [105]. O diferencial dessa técnica está relacionado ao tamanho do foco tubo de raios X e a resolução espacial do detector. O tamanho do foco pode variar desde 4 à 1 mm (foco normal) até 100 à $1\mu\text{m}$ (micro foco), passando pelas dimensões de 1 à 0,1 mm (minifoco) [106].

O diâmetro do foco do tubo de raios X é limitado pela quantidade de calor gerada no alvo do tubo. Devido ao pequeno diâmetro do foco de raios X, a potência térmica específica para a área no foco de raios X é muito alta, o que obriga estabelecer limites à capacidade de carga do alvo. Caso essa limitação não ocorra, o metal do alvo pode sofrer vaporização. Um bom material do alvo é aquele que possui uma alta temperatura de fusão e uma boa condutibilidade e exemplos desses materiais são tungstênio (W), molibdênio (Mo) e o Titânio (Ti), sendo o W o elemento que suporta maiores cargas (figura II.22). O produto da potência específica da superfície do tubo e do seu diâmetro é constante, com isso quanto menor for o diâmetro do foco, tanto menor será a potência máxima permitida [90].

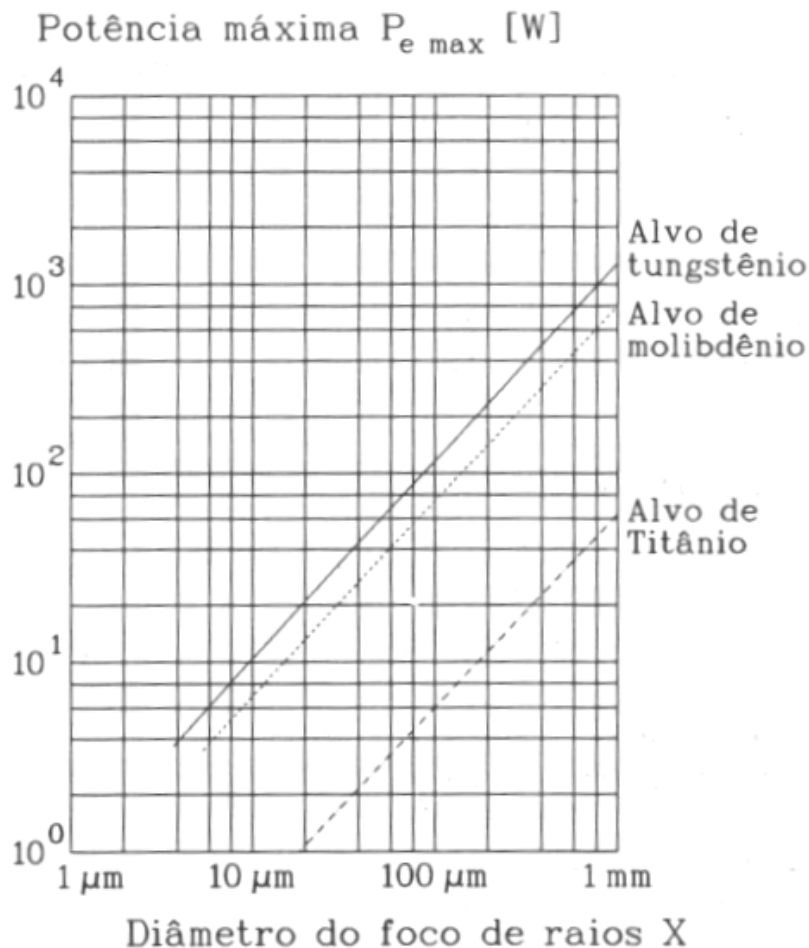


FIGURA II. 22 – CAPACIDADE DE CARGA DO ALVO.

O pequeno diâmetro do foco do tubo de raios X é um atributo muito importante do ensaio de μ CT. Isso ocorre porque quanto menor for esse parâmetro melhor se dará a focalização das estruturas inspecionadas que está intimamente relacionada com a qualidade da imagem adquirida no ensaio microtomográfico [107]. As duas características que determinam a qualidade da imagem são nitidez (clareza da imagem) e contraste (reconhecimento entre as diversas estruturas da imagem). A nitidez da imagem está ligada a desfocagem geométrica e à ampliação da imagem. O contraste está relacionado com o coeficiente de atenuação. Em poucas palavras pode-se dizer que quanto menor o diâmetro do tubo de raios X menor será a desfocagem geométrica e, portanto melhor será a qualidade da imagem [108,109].

A figura II.23 mostra uma composição de um sistema 3D similar ao utilizado nesse trabalho.

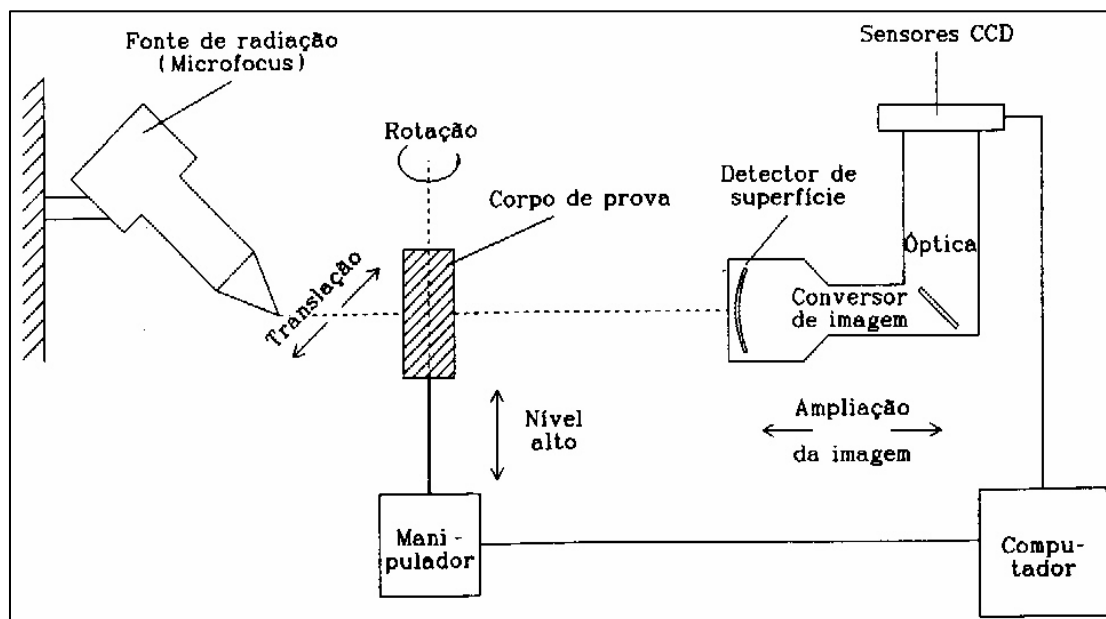


FIGURA II. 23 - PRINCÍPIO DE COMPOSIÇÃO DE UM APARELHO DE CT.

II. 5. Parâmetros Ósseos Quantificados através da Micro-CT

II. 5.1. Parâmetros Ósseos Estruturais

Para um melhor entendimento, primeiramente, será apresentada uma tabela II.5.2 [110] com as principais notações utilizadas nessa seção e, posteriormente, o desenvolvimento dos parâmetros estruturais ósseos utilizados nesse trabalho.

TABELA II.2 – LISTA DOS SÍMBOLOS BÁSICOS E SUAS DEFINIÇÕES.

Símbolos	Dimensões	Definições
P	-	Número de elementos pontos ou de pontos testes ^(*) .
P_P (P/P)	-	Fração de pontos. Número de pontos (na área característica) por pontos teste.
L	mm	Comprimento da linha de teste
P_L (P /L)	mm^{-1}	Número de pontos de intersecção por unidade de comprimento das linhas de teste.
P_A (P/A)	mm^{-2}	Número de pontos por unidade de área teste.
A	mm^2	Área teste.
A_A (A/A)	mm^2 / mm^2	Fração de área.
S	mm^2	Superfície ou área da interface.
S_V (S/V)	mm^2 / mm^3	Área superfície por unidade de volume teste.
V	mm^3	Volume teste.
V_V (V/V)	mm^3 / mm^3	Fração de volume. Volume da característica por unidade de volume teste.

(*) Quantidades testes, podem ser pontos, linhas, superfícies ou volumes.

A figura II. 24 ilustra algumas relações entre, linhas e pontos em duas dimensões.

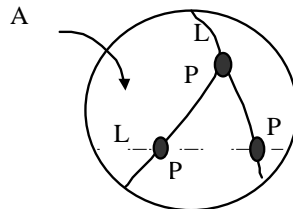


FIGURA II.24 – LINHAS E PONTOS NA SEÇÃO PLANA.

Quantificação Óssea através da Micro-CT

Os parâmetros levantados neste trabalho se dividem em dois grupos: primários e derivados. Fazem parte do primeiro grupo dois parâmetros: a razão do volume de tecido ósseo sobre o volume total da amostra (BV/TV - %) e o número de trabéculas ósseas, sendo também um índice que expressa a densidade trabecular (TbN-1/mm), dados por [111]:

$$\frac{BV}{TV} = P_P \quad (VI),$$

$$TbN = P_L \quad (VII).$$

Esses parâmetros básicos são todos adquiridos em seções bidimensionais, e envolvem a contagem de pontos, linhas e áreas. Os termos pontos e linhas de teste se referem às todas as linhas e pontos contados com relação a alguma característica da microestrutura contida na seção plana.

Tem-se que P_P é a fração de pontos que se encontram dentro do osso e P_L é o número de interseções de linhas de teste com a interface entre tecido "mole" e osso, dividido pelo comprimento total de linhas de teste. Isso pode ser melhor entendido visualizando a figura II. 25.

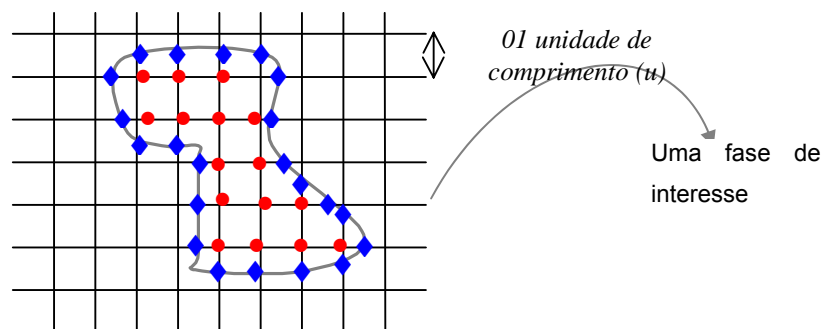


FIGURA II.25- ESQUEMA ILUSTRATIVO MOSTRANDO A REPRESENTAÇÃO DE P_P E P_L , NUMA MATRIZ SUPERPOSTA À IMAGEM 8X6.

Com \blacklozenge representando P_L e \bullet representando P_P , sendo $P_P=16$ e $P_L= 22 / (1 u \times 48)$.

A partir desses parâmetros podem-se obter os ditos derivados, e são eles: razão da superfície do osso contra o volume do mesmo (BS/BV - %), espessura trabecular (Tb.Th - mm) e separação trabecular (Tb.Sp - mm). Eles podem ser calculados através das seguintes equações [112]:

$$\frac{BS}{BV} = \frac{2P_L}{P_P} \quad \text{(VIII);}$$

$$TbTh = \frac{2}{BS/BV} = \frac{P_P}{P_L} \quad \text{(IX);}$$

$$TbSp = \frac{1}{TbN} - TbTh = \frac{1 - P_L}{P_P} \quad \text{(X).}$$

É de grande utilidade comparar as quantidades medidas em 2D e em 3D. O triângulo formado na tabela II. 5.3 [111] enfatiza as inter-relações entre os parâmetros.

TABELA II.3 – RELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS MEDIDOS (O) E CALCULADOS(□).

Aspecto da Microestrutura	Dimensões dos símbolos			
	mm ⁰	mm ⁻¹	mm ⁻²	mm ⁻³
Pontos	(P _p)	(P _L)	(P _A)	(P _V)
Linhas	(L _L)	(L _A)	(L _V)	-
Superfícies	(A _A)	(S _V)	-	-
Volumes	(V _V)	-	-	-

Quantificação Óssea através da Micro-CT

Todos os símbolos estão inter-relacionados por equações (XI, XII, XIII, XIV) com exceção dos da primeira coluna.

$$Vv=A_A=L_L=Pp \quad (XI).$$

$$Sv=(4/\pi). L_A=2PI \quad (XII).$$

$$Lv=2P_A \quad (XIII).$$

$$Pv=1/2 LvSv = 2P_AP_L \quad (XIV).$$

II. 5.1.1. Dados bidimensionais

Todas as quantificações mencionadas podem ser feitas por um processo internacionalmente estabelecido, que é a histomorfometria óssea. Nesse ensaio possui várias etapas, iniciado por um processo histológico e finalizado com o material fixado em lâminas de vidro, se tornando um método totalmente destrutivo [113]. A partir de então, tem-se a sua visualização em microscópio óptico com o intuito de quantificar as mesmas, através de um programa computacional que leva em consideração os mesmos conceitos de estereologia apresentados anteriormente.

Seguindo esta abordagem, tem-se um método de levantamento dos parâmetros histomorfométricos a partir de imagens tomográficas [114 - 117]. O método oferece diversas vantagens em relação ao método histomorfométrico convencional, dentre elas podem ser destacadas as seguintes:

- i) Um ensaio não destrutivo em que as seções tomográficas formam um conjunto de planos paralelos que podem ser examinados seqüencialmente;
- ii) O trabalho do observador de preparar, examinar e trocar as lâminas (que ocorre no processo convencional) é substituído pelo processamento dos dados tomográficos, realizados por um computador;
- iii) Na histomorfometria, as extrações dos parâmetros são dependentes das imagens escolhidas. Com isso, se a ao longo de todos os cortes histológicos a estrutura da amostra não for

homogênea os resultados podem conduzir a uma falsa conclusão (observa-se uma grande variação dos valores ao longo das seções). Já a tomografia tridimensional fornece toda a informação espacial necessária para que os parâmetros espaciais BV/TV e BS/BV sejam calculados diretamente do volume de dados.

O processo de quantificação 2D consiste em binarizar a imagem, escolher o valor ótimo “threshold” e por fim, fazer as quantificações dos parâmetros.

O processo de binarização consiste na escolha de um valor limiar que será aplicado à imagem. Todos os “pixels” cujo valor for maior ou igual ao do limiar serão convertidos em um valor chamado de saturado. Em uma imagem digital com resolução de 8 bits, este valor saturado vale 255. De forma análoga, todos os “pixels” que tiverem valor inferior ao do limiar, serão convertidos em 0. O resultado é uma imagem preta e branca, onde a fase branca corresponde ao tecido ósseo e a fase preta ao restante do tecido.

A escolha do valor de “threshold” é crítico, pois depende das características do sistema tomográfico, em especial, das características energéticas do feixe de raios X [11,15]. Existem vários métodos para a escolha desse valor e o assunto continua em aberto até os dias atuais, não havendo nenhum procedimento padrão ou outro que deve ser seguido. Dentre eles destaca-se a escolha do “threshold” com base na derivada parcial do parâmetro BV/TV em relação aos vários valores de limiar que podem ser obtidos, dentro de um intervalo pré-estabelecido. Quando esta derivada for igual a zero, tem-se que os valores de TH acima do encontrado não mais influem significativamente dos valores de BV/TV e, então se encontra o valor mais correto para o limiar [11].

Quantificação Óssea através da Micro-CT

Com a imagem binarizada, o passo seguinte é o cálculo dos parâmetros básico P_P e P_L que podem ser obtidos para todas ou quaisquer seções da reconstrução 3D. P_P e P_L são obtidos diretamente da imagem binária da seguinte forma: o total de “pixels” brancos (que correspondem à fase de interesse) dividido pelo total de “pixels” da imagem é o valor de P_P ; usando um processo de detecção de borda, determina-se o perímetro da fase de interesse, e do total de “pixels” brancos (que compõem a borda) dividido pelo total de “pixels” da imagem, determina-se P_L . De posse dos dois parâmetros básicos, todos os outros podem ser calculados. Este processo pode ser observado na figura II. 26.

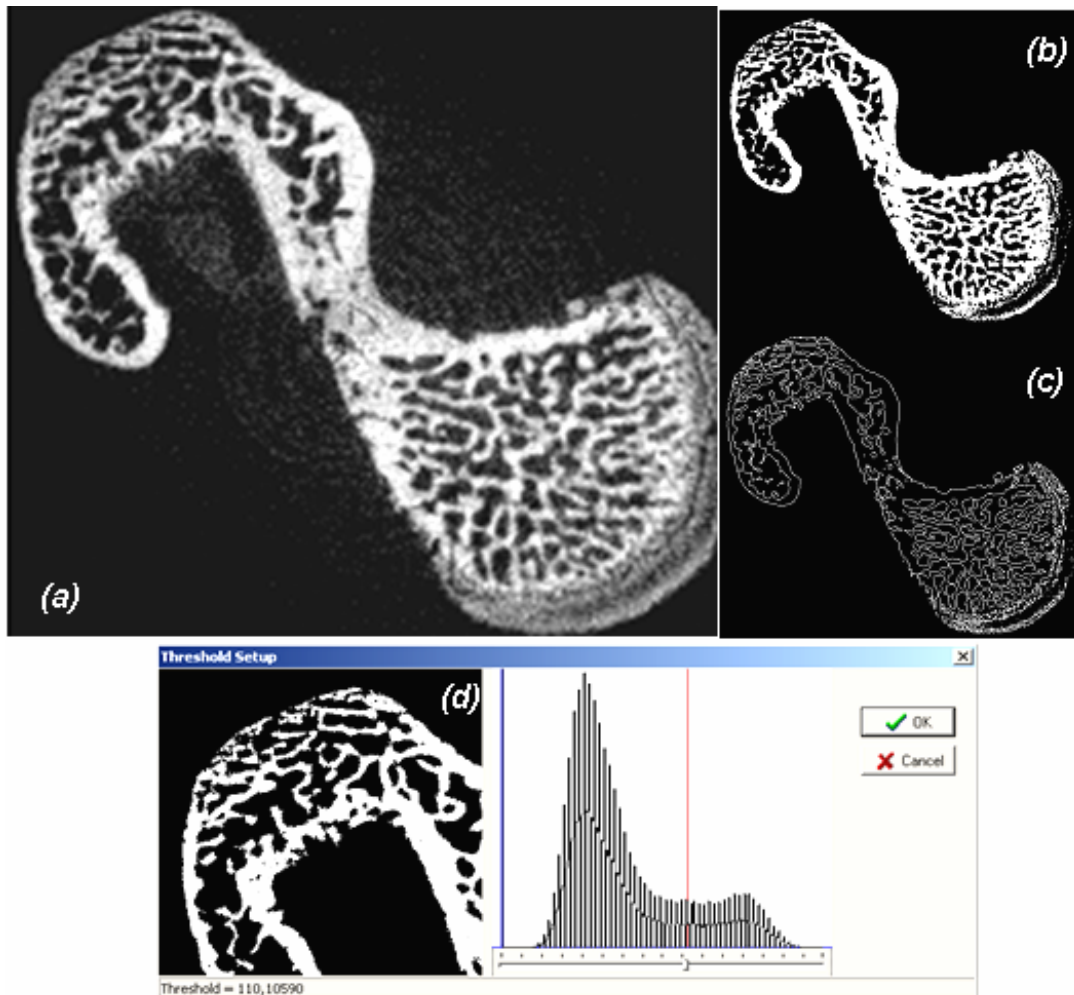


FIGURA II.26– PROCESSO DE SEGMENTAÇÃO: (A) IMAGEM ORIGINAL, (B) IMAGEM BINARIZADA, (C) IMAGEM SEGMENTADA, (D) HISTOGRAMA DA IMAGEM.

O valor de BV/TV é equivalente a P_P , e BS/BV é $2P_L/P_P$, seguindo a metodologia apresentada pela quantificação estereológica.

II. 5.1.2. Dados tridimensionais

O maior problema da histomorfometria (ou quantificação estereológica) é seu caráter de extrapolação. As análises baseadas nesta técnica são fortemente dependentes das imagens escolhidas para a extração dos parâmetros. Se a amostra possui uma microestrutura que não seja homogênea ao longo das seções, os resultados podem conduzir a uma falsa conclusão. Quando a histomorfometria é aplicada a uma amostra biológica observa-se uma grande variação dos valores ao longo das seções. Apoiar-se numa média dos valores pode não ser a melhor solução.

A tomografia tridimensional fornece toda a informação espacial necessária para que os parâmetros espaciais BV/TV e BS/BV sejam calculados diretamente do volume de dados [15]. Podem-se aplicar dois métodos de extração de valores sendo um deles uma simples extensão do método já utilizado nas seções bidimensionais, e outro, mais sofisticado, que tenta representar melhor a morfologia da microestrutura.

O primeiro método continua baseado na contagem dos “pixels” brancos contidos na microestrutura e nas suas bordas, sendo aplicado, porém, a todas as seções, isto é, ao invés de se contar somente os “pixels” de uma imagem, avaliam-se a soma total de todos os “pixels” brancos contidos no volume de dados, tanto para o cálculo de P_P quanto de P_L . A soma de todos os “pixels” brancos contidos na microestrutura equivale ao volume da fase de interesse; a soma de todos os “pixels” brancos contidos nas bordas de cada imagem forma o total de pontos presentes na superfície da fase de interesse. Dividindo ambas as somas pelo total de “pixels” presente no volume de dados, têm-se os valores de P_P e P_L . A partir destes dois valores, calcula-se dos demais, usando as equações já apresentadas.

A segunda forma de cálculo é através da representação do volume da microestrutura por “voxels” (ou “pixels” tridimensionais). O uso de modelos pré-configurados de “voxels” facilita o cálculo das áreas e dos volumes. A lista com os modelos, suas áreas e seus respectivos volumes pode ser visualizada em [94]. Nesse processo, a superfície e o volume totais da microestrutura são contabilizados somando-se as áreas e os volumes de cada modelo encontrado no volume de dados. Este método difere do primeiro apenas no fato de se ajustar melhor a morfologia da fase de interesse; ela representa melhor o contorno da superfície e, por conseguinte, do volume. A partir do valor da superfície total (BS) e do volume total da fase (BV), podem-se calcular os demais parâmetros. O volume total da amostra (TV) é o total de “voxels” do volume de dados.

II. 5.2. Parâmetro Ósseo Morfológico - Anisotropia bidimensional

A anisotropia é um parâmetro morfológico que apresenta como resultado final o grau de orientação das conexões presentes na estrutura óssea estando relacionada com as propriedades biomecânicas do osso de suporte de carga [96].

O procedimento de cálculo da anisotropia 2D está calcado na técnica de contagem de interseções chamada de método do comprimento médio de interseção (MIL - *Mean Intercept Length*) [118]. A metodologia para tal parâmetro consiste em contar o número de interseções entre uma grade linear e a estrutura como função da orientação da grade. O MIL é o comprimento total das linhas da grade dentro das conexões dividido pelo número de interseções, indicado pelo símbolo L_i , onde i é o ângulo para o qual o MIL foi calculado. Calculando-se este valor para diferentes direções (cobrindo uma faixa angular de 180°) e colocando este resultado em um diagrama polar, é possível verificar onde a densidade de interseções foi maior ou menor (figura II.27).

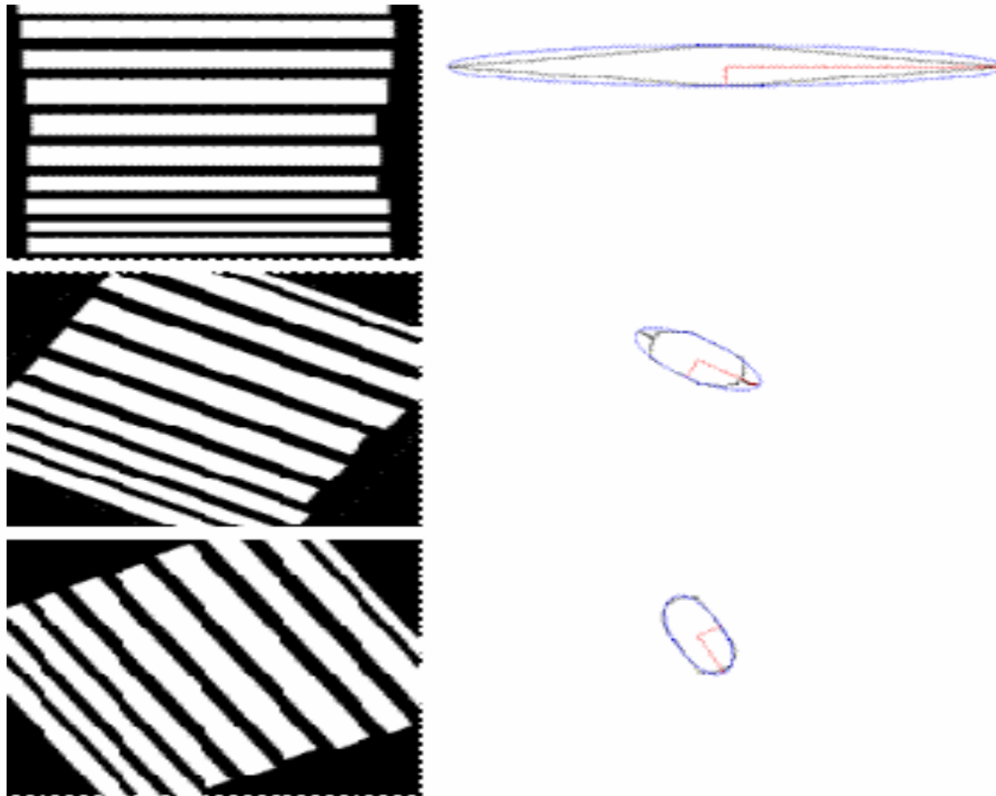


FIGURA II.26– ILUSTRAÇÃO DA ANISOTROPIA DE CADA UMA DAS IMAGENS. O EIXO MAIOR DA ELIPSE REPRESENTA A DIREÇÃO PREFERENCIAL.

Uma forma de visualizar este gráfico é através de uma elipse ajustada sobre a curva (figura 10) sendo que os semi-eixos da elipse indicariam as direções preferenciais da estrutura do objeto estudado. O ajuste da elipse sobre os dados do MIL versus ângulo é obtido calculando-se os autovetores e autovalores da matriz **T** abaixo:

$$\mathbf{T} = \begin{bmatrix} \sum L_i^2 x_i^2 & \sum L_i^2 x_i y_i \\ \sum L_i^2 x_i y_i & \sum L_i^2 y_i^2 \end{bmatrix}$$

Onde:

x_i e y_i são as projeções do vetor unitário para o ângulo i .

A interpretação da elipse é dada pela razão entre o maior e o menor eixo (perpendiculares entre si) que indicam o grau de anisotropia, e o ângulo entre os eixos da elipse e do sistema de referência assinalam a orientação estrutural. Na caracterização de um objeto 3D, a anisotropia é calculada levando-se em conta os três principais planos (XY, XZ e YZ) – um gráfico para cada plano.

II. 6 – A Técnica de Fluorescência de Raios X

A Técnica de Fluorescência de raios X (XRF) é um método qualitativo e quantitativo utilizado para determinar os elementos presentes em um determinado material [119]. Esse procedimento está baseado no fato dos elementos químicos emitirem radiações características quando excitados como resultado da interação fotoelétrica. No entanto, o espalhamento coerente e incoerente geralmente contribui no espectro resultante como radiação de fundo, o que tende a interferir com os raios X característicos. A parte qualitativa da técnica consiste na obtenção dos espectros dos raios X característicos e, o ramo quantitativo, está baseado na determinação da concentração de cada um dos elementos presentes na amostra inspecionada.

Para que haja a emissão dos raios X característicos, a amostra tem que ser excitada e isso pode ocorrer por partículas carregadas aceleradas (elétrons, prótons ou íons), pelos raios X, raios gama, partículas alfa ou partículas betas provenientes da emissão de um dado radionuclídeo ou ainda por tubos geradores de raios X. Neste trabalho, foi utilizado um tubo gerador de raios X para o processo de excitação das amostras analisadas.

Uma vez que o material de interesse é excitado, ocorre à obtenção dos espectros (um gráfico de dispersão ou em linha em que seus eixos são compostos pela intensidade da radiação característica e pelo número atômico de cada elemento). A intensidade de cada linha espectral é proporcional ao número de átomos que emitem fótons de energia atribuídos a essas linhas. A concentração elementar pode ser obtida através da sua relação com a intensidade dos raios X emitidos com certa energia (sem considerar o efeito matriz – de absorção).

Bohr aplicou a teoria quântica de Planck e Einstein ao átomo nuclear de Rutherford e formulou o bem conhecido modelo planetário do átomo (figura II. 27 [120]). Ele considerava que os elétrons “ocupavam” estados “estacionários” (de energia fixa e não de posição fixa) a diferentes distâncias do núcleo, e que podiam realizar “saltos quânticos” de um estado de energia mais alta para outro estado de energia mais baixa.

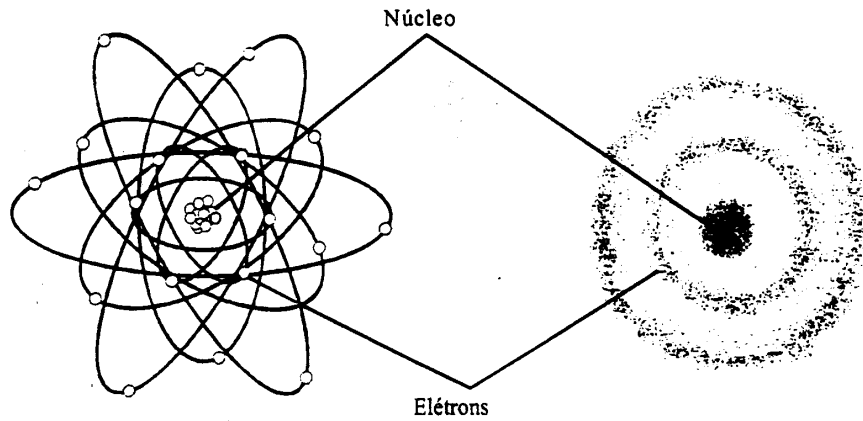


FIGURA II.27– REPRESENTAÇÃO DE MODELOS ATÔMICOS: (A) GEOMÉTRICA, ONDE OS ORBITAIS SÃO TRAJETÓRIAS GEOMÉTRICAS, PERCORRIDAS POR ELÉTRONS; (B) QUÂNTICA, ONDE OS ORBITAIS SÃO REPRESENTADOS POR NUVENS ENVOLVENDO O NÚCLEO, ONDE PARA CADA POSIÇÃO GEOMÉTRICA EXISTE UMA PROBABILIDADE ASSOCIADA DE ENCONTRAR O ELÉTRON.

Na figura II.28 (a,b) tem-se uma representação didática dos saltos quânticos. Em relação à figura II.28(a), em vermelho é mostrado um elétron saltando do terceiro para o segundo nível e, em verde, um elétron saltando do segundo para o estado fundamental. A soma das energias (e das freqüências) correspondentes a esses dois saltos é igual à energia (e à freqüência) do salto quântico, do terceiro nível diretamente para o estado fundamental, mostrado em azul. Em outras palavras, se um elétron é elevado ao terceiro nível de energia, ele pode retornar ao seu estado original através de um único salto do 3º para o 1º nível – ou por meio de um salto duplo, primeiro até o 2º nível e daí para o 1º. Essas duas possibilidades de retorno produzirão um total de três linhas espectrais.

Nem todas as transições entre os estados quânticos são possíveis e a regra de seleção é [89]:

$$\Delta l = -1 \quad (XV),$$

$$\Delta j = 0, \pm 1 \quad (XVI).$$

Com:

l sendo o número quântico orbital e j a representação da soma vetorial de l e s e, esse último, é o número quântico de spin.

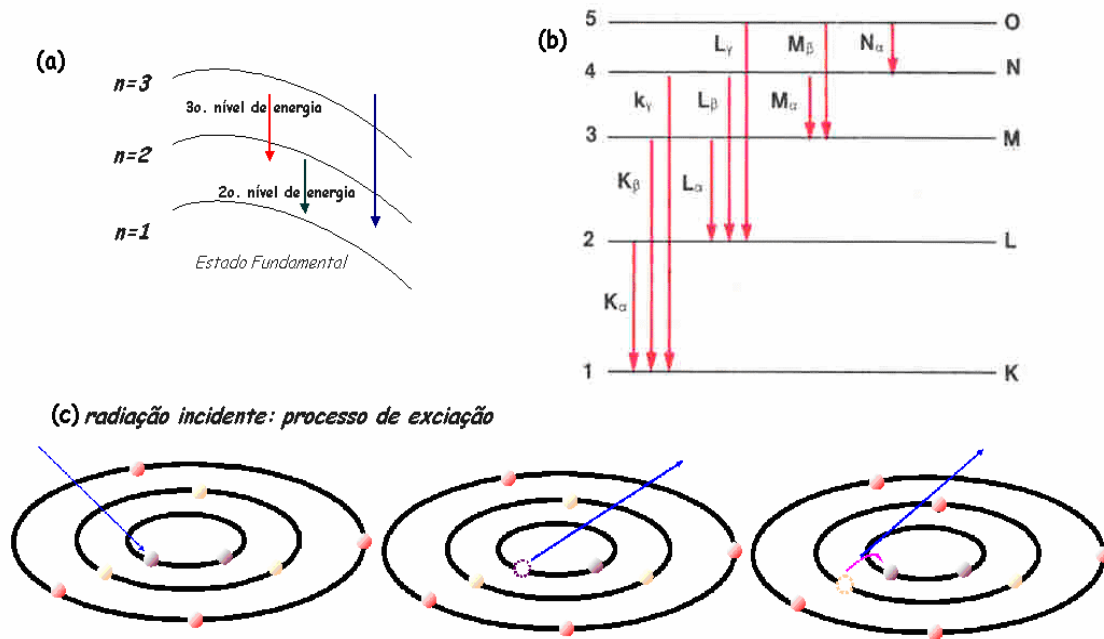


FIGURA II.28– ESQUEMA DOS NÍVEIS DE ENERGIA PARA A FORMAÇÃO DOS RAIOS X CARACTERÍSTICOS DE UM ELEMENTO (REPRESENTAÇÃO DIDÁTICA): (A) TRÊS DOS INÚMEROS NÍVEIS DE ENERGIA DE UM ÁTOMO, (B) CINCO DOS INÚMEROS NÍVEIS DE ENERGIA, (C) PRODUÇÃO DOS RAIOS X CARACTERÍSTICOS.

II. 6.1 – Fluorescência de Raios X por dispersão em energia (EDXRF)

Dentre as diversas técnicas de XRF, descrever-se-á uma em particular: fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF).

EDXRF, como todo método de XRF, possui natureza multielementar (os raios X de todas as energias são medidos simultaneamente) [121]. Os raios X são registrados através de pulsos eletrônicos, produzidos em um detector, sendo as amplitudes desses pulsos proporcionais às energias dos raios X,

conectados a um analisador multicanal. O processo analítico é não destrutivo, requer pouca ou nenhuma preparação de amostra e pode ser feito em poucos minutos (aquisição dos espectros).

II.6.1.1 – O Cálculo da Concentração Elementar

Um método muito utilizado nessa técnica é o Método dos Parâmetros Fundamentais. Segundo SHIRAIWA *et al* [122], se baseia na dependência da intensidade da radiação fluorescente em termos de parâmetros físicos fundamentais e de parâmetros instrumentais.

Com auxílio da figura II. 29 e para uma amostra homogênea composta por n elementos com diferentes concentrações (W_i , $i=1,, \dots,n$), possuindo uma densidade ρ_M e uma espessura d , tem-se que a relação entre a intensidade da radiação fluorescente (I_i) e a concentração de um elemento i presente na amostra é dada por [123]:

$$W_i = I_i/S_i A(E_o,E_i) \quad (XVII).$$

Onde:

S_i representa a sensibilidade do sistema para o elemento i na amostra,
 $A(E_o,E_i)$ representa o termo de absorção da radiação na amostra dado por:

$$A(E_o,E_i) = \frac{[1 - \exp(-\chi_i(E_o,E_i).\rho_M.d)]}{\chi_i(E_o,E_i)}, \quad (XVIII).$$

Sendo:

$\chi_i(E_o,E_i)$, o coeficiente de absorção de massa para a energia do feixe incidente (E_o) e emergente (E_i) dado por:

$$\chi_i(E_o, E_i) = \frac{\mu_M(E_o)}{\text{sen}(\theta_1)} + \frac{\mu_M(E_i)}{\text{sen}(\theta_2)}, \quad (\text{XIX}).$$

Onde:

μ_M representa o coeficiente de absorção de massa e θ os ângulos incidentes (1) e transmitidos (2).

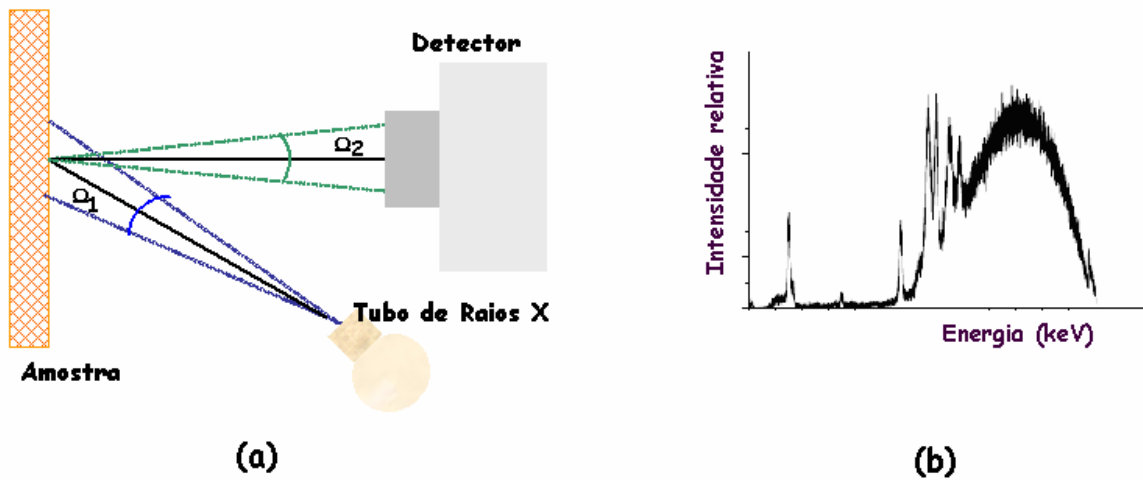


FIGURA II.29– REPRESENTAÇÃO DIDÁTICA: (A) ARRANJO EXPERIMENTAL DE EDXRF, (B) TÍPICO ESPECTRO REGISTRADO PELO DETECTOR.

A sensibilidade é função dos parâmetros fundamentais K_i , da eficiência de detecção ($\varepsilon(E_i)$) e do fator geometria (G), conforme mostra a equação seguir [124, 125]:

$$S_i = G K_i \varepsilon(E_i) \quad (\text{XX}).$$

Com:

$G = I_o \Omega_1 \Omega_2$ sendo I_o a intensidade fluorescente, Ω_1 o ângulo sólido relativo à fonte e Ω_2 , o ângulo sólido em que a radiação fluorescente chega ao detector.

$K_i = [\tau_i (E_0) \omega_{i,K-L2,3} f_{i,K-L2,3} (r_k - 1/ r_1)]$, é denominado de constante dos parâmetros fundamentais e depende apenas de propriedades físicas da produção de fluorescência de raios X.

A determinação da concentração **W** de um elemento **i** na amostra pode ser feita medindo-se a intensidade da radiação fluorescente, conhecendo-se a curva de sensibilidade do sistema e a absorção da radiação na amostra.

II. 6.1.2 – O Cálculo do Fator de Absorção

A determinação do fator de absorção (equação XVIII) nas amostras inspecionadas pode ser calculada através de métodos semi-empíricos, tais como o Método da Emissão-Transmissão, o Método da Razão entre o Espalhamento Coerente e o Incoerente, e o Método da Transmissão da Radiação, explicitados em [126], [127] e [128], respectivamente. O último método referido foi o utilizado nesse trabalho e é uma variação do primeiro.

O Método da Transmissão da Radiação está calcado na hipótese de que se pode representar a absorção da radiação em uma determinada amostra através de uma função potência, dada pela equação XXI [129].

$$\mu_M (E) = A \cdot E^b \quad (XXI).$$

Onde:

$\mu_M (E)$ representa o coeficiente de absorção de massa;

E representa a energia;

A e b são constantes adimensionais.

Aplicando a função **ln** em ambos os lados da equação XXI têm-se:

$$\ln |\mu_M (E)| = \ln |A| + b \ln |E| \quad (XXII).$$

E, conhecendo-se os valores das constantes A e B, tem-se a curva de absorção da radiação. É importante salientar que a absorção é um parâmetro

que independe da geometria instrumental utilizada, porém fortemente dependente do tipo de amostras analisadas, tendo que ser determinado sempre que a composição da amostra for modificada.

A determinação das constantes A e b é feita experimentalmente através da transmissão da radiação para certas energias, com o auxílio da equação XXIII.

$$\mu_{M,i}(E) = \frac{1}{\rho D} \left(\ln \left| \frac{I_0}{I_i} \right| \right) \quad (\text{XXIII}).$$

Onde:

I_0 representa a radiação sem a amostra;

I_i representa a radiação transmitida na amostra, emitida por um elemento i, num alvo multielementar, conforme ilustrado na figura II. 30.

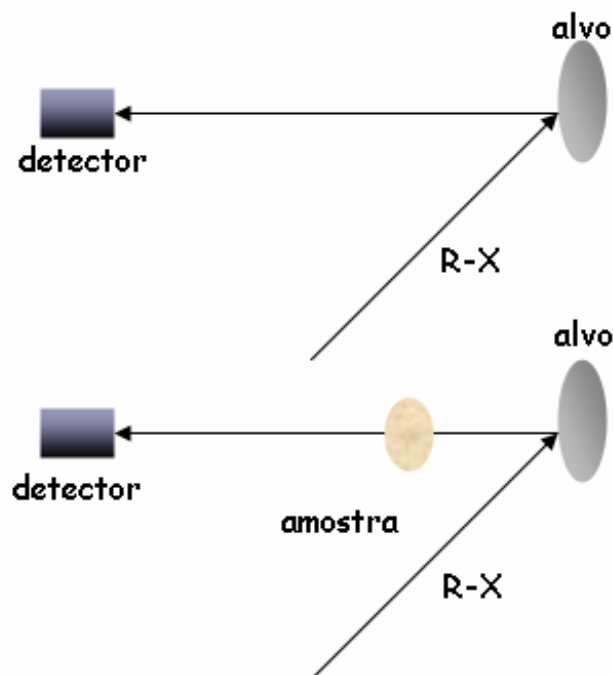


FIGURA II.30 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA GEOMETRIA DO MÉTODO DA TRANSMISSÃO DA RADIAÇÃO: (A) MEDIDA DE I_0 , (B) MEDIDA DE I_i .

O alvo multielementar ilustrado na figura II. 30 consiste de um material que possui elementos com concentrações conhecidas, sendo viável, portanto determinar a contribuição do parâmetro de absorção. Uma vez encontrados os valores experimentais do coeficiente de absorção de massa, tem-se o ajuste para uma reta, através do método estatístico dos mínimos quadráticos, estando determinadas as constantes A e b e com isso a curva de absorção que poderá ser utilizada para o cálculo da concentração elementar [130].

II. 6.1.3 – O Limite de Detecção

O Limite de detecção é a quantidade (massa, concentração, etc) mais baixa de um dado material que pode ser determinada para ser estatisticamente significativa da radiação de fundo [131]. A intensidade de uma linha característica, no espectro de fluorescência, decresce à medida que a concentração de material também diminui e, praticamente desaparece quando entra na região do ruído de fundo.

Na figura II.31 pode-se visualizar a diferença existente entre os sinais total, líquido e da radiação de fundo. A verdadeira intensidade de fundo pode ser constante, mas os resultados das medidas flutuam em torno de um valor médio. Para uma quantidade **N** de fótons detectados num intervalo de tempo **t**, o desvio padrão associado, seguindo a estatística de Poisson, é dado por [132]:

$$\sigma_N = \sqrt{N} \quad (\text{XXIV}).$$

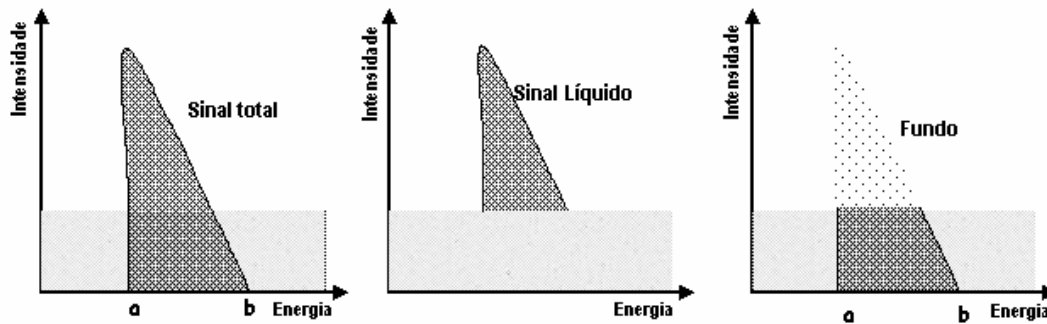


FIGURA II.31 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SINAL PROVENIENTE DA RADIAÇÃO DE FUNDO E LÍQUIDO.

A União Internacional de Química Pura e Aplicada recomenda que o sinal característico seja estatisticamente atribuído a um elemento quando ele alcançar não menos que 3σ acima do nível da radiação de fundo, representando um nível de confiança de 99,86%, supondo uma distribuição normal. Logo, o limite de detecção é calculado com um desvio padrão multiplicado pelo fator $k=3$ e é expresso como uma função da intensidade I em unidade de tempo ($N= I/t$) sendo t a contagem de tempo e a sensibilidade S , que é expressa em cps/ % ou cps/ppm (contagens por segundo por porcentagem ou contagens por segundo por parte por milhão, respectivamente). Logo, o limite mínimo de detecção pode ser escrito da seguinte forma [133]:

$$LMD = \frac{3\sigma_N}{S_i} = \frac{3\sqrt{N}}{S_i} = \frac{3}{S_i} \sqrt{\frac{I_{i,bg}}{t}} \quad (XXV).$$

Onde:

S_i representa a sensibilidade de cada elemento i (cps $g^{-1}cm^2$);

$I_{i,bg}$ é a intensidade da radiação de fundo (cps);

t representa o tempo de medida (s).

Para amostras espessas ou semi-espessas deve ser considerado o fator de absorção e então a equação XXV pode ser reescrita da seguinte forma [134]:

$$\text{LMD} = \frac{3}{S_i \cdot A} \sqrt{\frac{I_{i,bg}}{t}} \quad (\text{XXVI}).$$

Onde:

A representa o fator de absorção (adimensional).

II. 6.2 – MicroFluorescência de Raios X por Radiação Síncrotron (μ XRF-SR)

Pode-se dizer que a Microfluorescência de raios X (μ XRF) é uma variante da EDXRF [135] em que um feixe de raios X microscópico é utilizado para excitar localmente uma pequena área da amostra (da ordem de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ou $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ quando empregado capilar óptico⁴) podendo-se realizar um mapeamento, ponto a ponto, da mesma. Com isso, tem-se a determinação da concentração elementar (de acordo com os princípios explicitados no item II. 6.1.1) juntamente com o mapeamento bidimensional superficial dos elementos químicos contidos na amostra. Logo, para cada ponto da amostra tem-se um espectro contendo todos os elementos presentes no local. Essa informação pode ser adquirida tanto para um perfil (uma linha na amostra) quanto para uma imagem de tamanho N x M (N representando a altura e M o comprimento) (figura II. 32).

⁴ Instrumento que reduz o diâmetro do feixe.

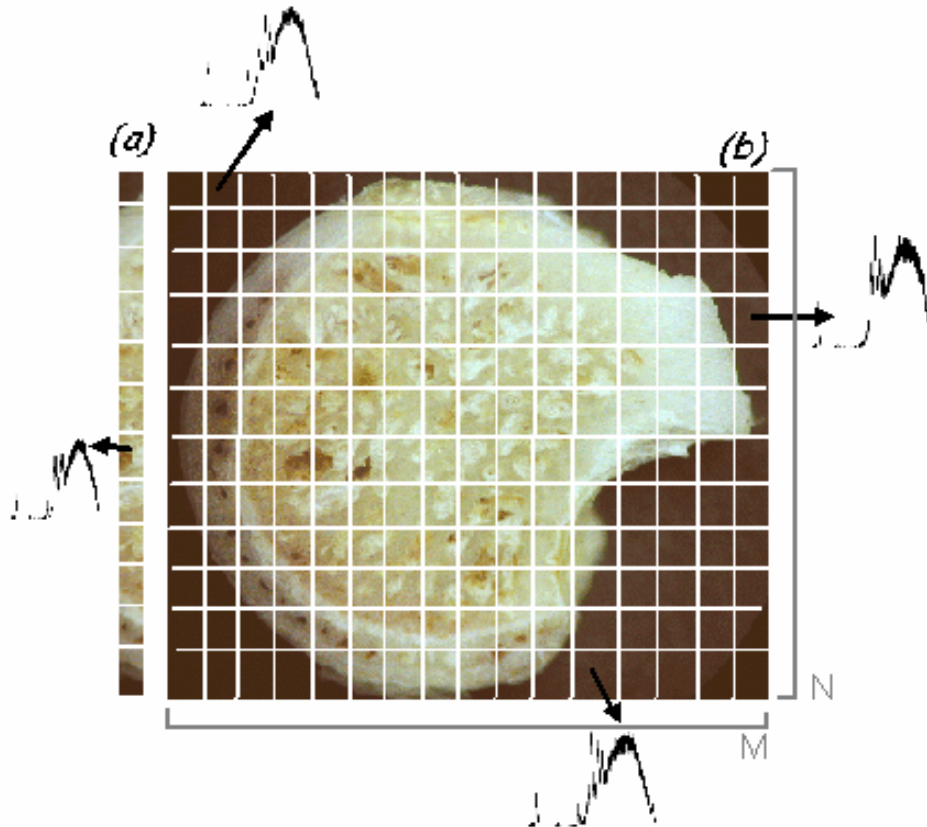


FIGURA II.32 – REPRESENTAÇÃO DO PERFIL (A) E DA IMAGEM(B) QUE SE ADQUIRE NA μ XRF.

Nessa técnica, é possível acompanhar, em tempo real, a imagem da amostra sendo analisada durante todo o processo, com centenas de pontos inspecionados por amostra, fazendo com que a mesma se torne uma potente técnica de imagem.

A radiação Síncrotron (SR) é uma radiação eletromagnética que é emitida quando partículas carregadas com velocidade relativística são submetidas à aceleração radial [136].

A fonte de luz Síncrotron é uma fonte de excitação que, quando utilizada permite alcançar baixos limites de detecção e, quando comparadas a tubos convencionais de raios X, é extremamente “brilhante”, ou seja, possui um alto brilho espectral resultando em um aumento da intensidade de raios X primários (da ordem de 3 à 5 vezes) [137]. Uma visão esquemática da fluorescência de

raios X por radiação Síncrotron (XRF-SR) é ilustrada na figura II. 33 [138]. A radiação primária, que origina do anel de armazenamento de radiação Síncrotron (S), é transformada em um microfeixe por um sistema óptico. Esse microfeixe é utilizado para excitar a região de interesse na amostra e, a fluorescência emergente e a radiação espalhada são detectadas por um detector.

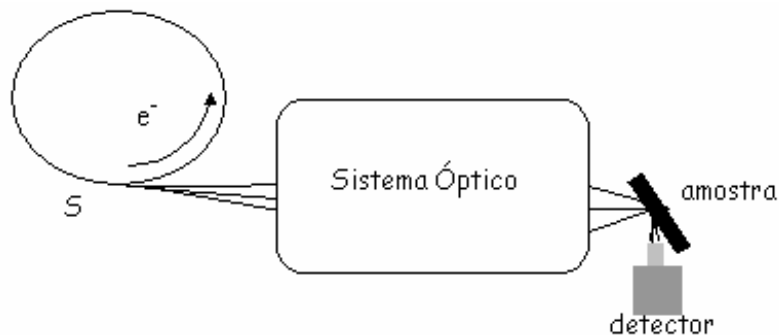


FIGURA II. 33 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO “SET-UP” TÍPICO DE XRF-SR.

As propriedades de uma fonte de luz são caracterizadas pelo seu fluxo espectral e brilho e, as da radiação Síncrotron, destacam-se as seguintes [138]:

- i) Alta estabilidade de intensidade;
- ii) Polarização: linear (no plano da órbita) e elíptica (acima e abaixo do plano da órbita para a radiação magnética da curva);
- iii) Alto grau de colimação.

No próximo capítulo, descrever-se-á toda a metodologia aplicada na obtenção dos dados necessários à realização desse trabalho.

CAPÍTULO III

III. Metodologia

Nesse capítulo será mostrada toda a metodologia utilizada para a aquisição dos dados, tanto na μ CT quanto na XRF.

Em relação à técnica de μ CT, foram tomografadas várias amostras ósseas para verificar as possíveis mudanças ocorridas na estrutura interna do osso, em diferentes situações, tais como, mudança de idade, mudança de sexo, doenças associadas a uma possível mudança óssea assim como a ingestão de etanol, castração e reposição de estrogênio. Todas as análises foram feitas na cabeça femoral de ratos Wistar. Uma outra análise foi executada em amostras de biópsias humanas com diversas patologias associadas. Após o ensaio tomográfico, todas as amostras foram quantificadas, estruturalmente e morfologicamente.

Através da técnica de EDXRF, procurou-se avaliar a concentração superficial dos elementos químicos presentes em amostras ósseas também em diferentes condições de estado, tais como: mudança de sexo, idade e sítio de interesse do fêmur de ratos Wistar.

Com o auxílio do procedimento analítico de μ XRF-SR buscou-se avaliar, em termos químicos, as concentrações elementares em amostras de ratas Wistar (controle, castradas e castradas com reposição de estrogênio), assim como a visualização bidimensional das mesmas, ou seja, a distribuição espacial dos minerais presentes nas amostras analisadas. Assim como a EDXRF, essa técnica também é um método de avaliação apenas na superfície das amostras analisadas, não sendo possível, portanto, fazer inferências ao longo das mesmas, isto é, em sua profundidade.

III. 1. MicroTomografia Computadorizada

III.1.1. O Equipamento para a Tomografia Computadorizada

O sistema utilizado foi o sistema de radiografia em tempo real, Fein-Focus, modelo FSX-160-50 (figura III. 1). Aparelho esse que opera dentro de um intervalo de tensão de 0 a 160 kV e de corrente de 0 a 1 mA. Possui um tamanho de foco variável com a potência aplicada [91]. O ajuste de tensão e corrente está diretamente ligado ao tipo de material que será inspecionado e ao tamanho focal do tubo de raios X [91,92], pois, quanto mais denso for o material maior deverá ser a energia da radiação incidente e, quanto maior a potência aplicada maior será o tamanho do foco. Uma outra relação importante a ser levada em consideração é a ligação entre o coeficiente de atenuação do material e o diâmetro do mesmo, de acordo com [108]. Todos os fatores citados anteriormente contribuem significativamente para uma melhor qualidade de imagem.

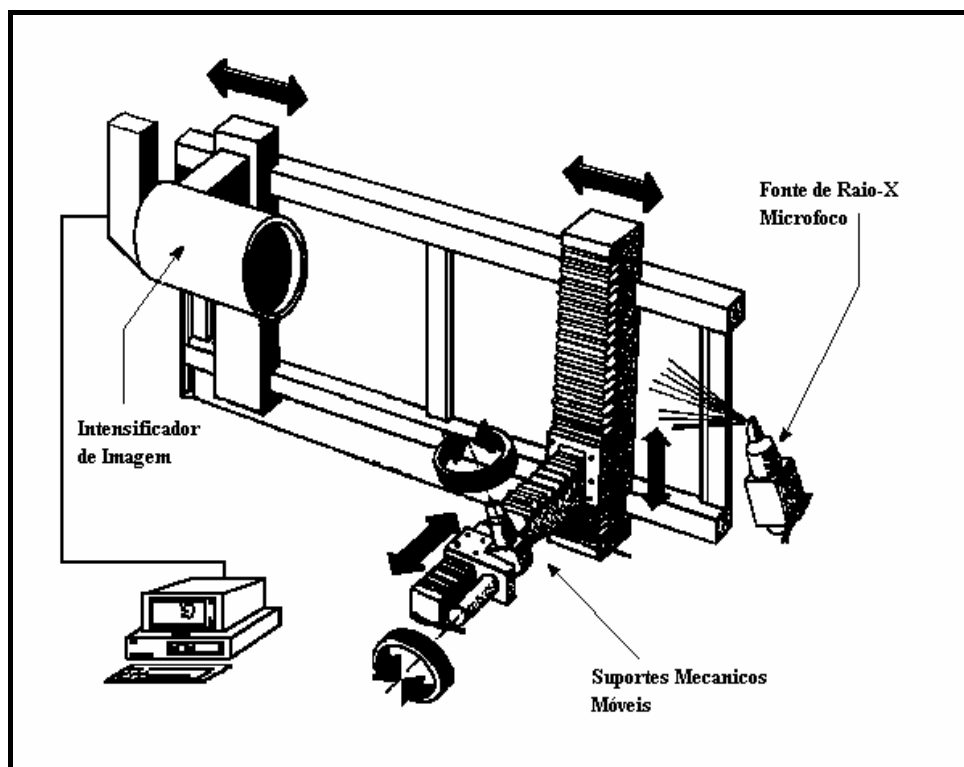


FIGURA III.1 – ESQUEMA GERAL DO SISTEMA DE RAIOS X EM TEMPO REAL MICROFOCO.

Como visto na figura III.1 este sistema é composto por uma fonte de raios X microfoco, um sistema de detecção (intensificador com tela fluoroscópica acoplado a uma câmara tipo CCD) e um sistema de manipulação (suportes mecânicos móveis).

A fonte é um tubo de raios X microfoco (figura III.2), onde em sua cabeça se encontra um alvo cilíndrico de tungstênio. Tem-se a produção do feixe de raios X sobre um ângulo sólido de 40° . Este tubo, que possui foco variável de acordo com a potência aplicada e uma janela de berílio com 0,5 mm de espessura.

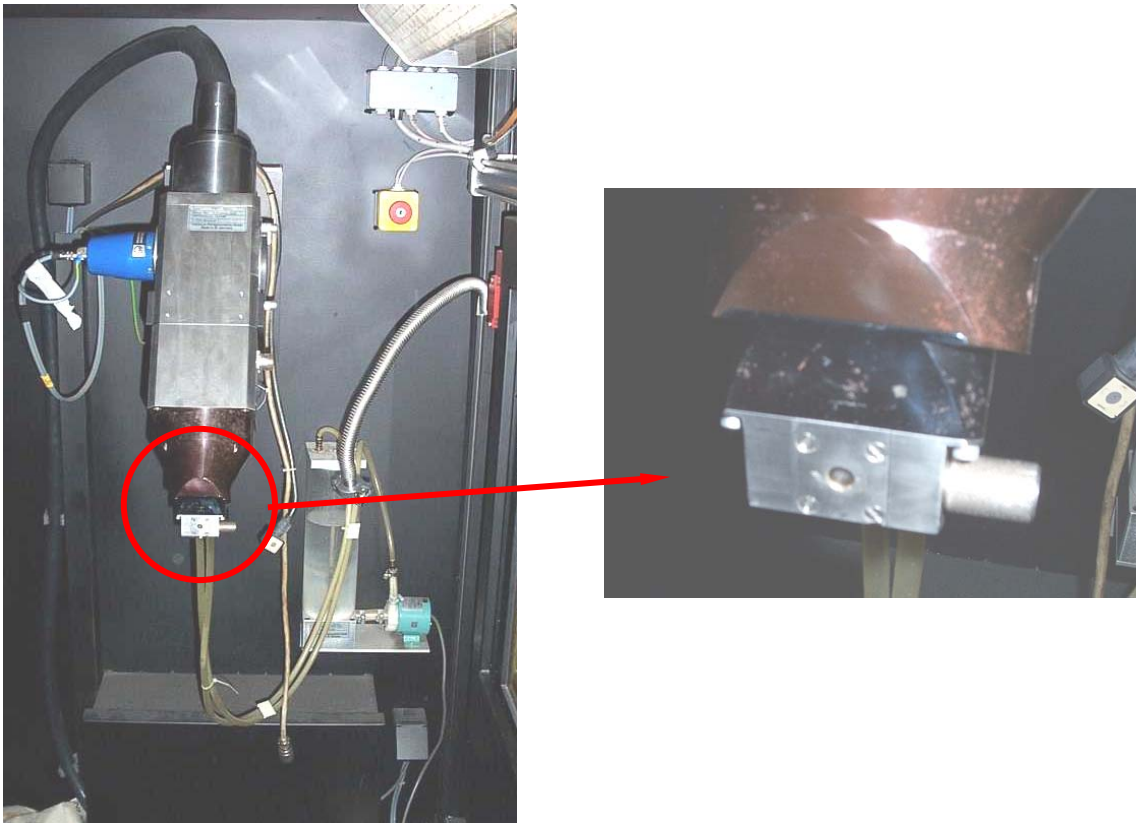


FIGURA III.2 - TUBO DE RAIOS X MICROFOCO E DETALHE DO ALVO E DA JANELA DE SAÍDA.

O sistema de detecção é composto por um tubo intensificador de imagem, marca Thomson com tela fluoroscópica, que transforma os fótons de raios X em fótons de luz, acoplado a uma câmara de vídeo tipo CCD (figura III.3). O sinal eletrônico que vem do intensificador é capturado pela câmara e

então enviado a um monitor de televisão que está no console do sistema. Com isso então, tem-se a representação da imagem radiográfica em tempo real.



FIGURA III.3 - DETALHE DO POSICIONAMENTO DA CÂMERA DIGITAL ACOPLADA AO INTENSIFICADOR DE IMAGEM.

O sistema de manipulação é constituído por um centralizador acoplado a um servo motor (braço mecânico – figura III.4), que além de indicar a posição correta do corpo de prova ainda o movimentam verticalmente, horizontalmente e longitudinalmente, proporcionando desta forma o melhor posicionamento possível do objeto, a fim de se obter as melhores definições de imagem.

O sinal eletrônico, enviado pela CCD ao monitor de vídeo, é transformado em digital, matriz de tamanho 400 x 400, por uma interface

Analógica-Digital de 8 bits. Este sinal é processado em tempo real por um microcomputador Pentium-233MHz com 64MB de memória RAM e apresentado num monitor de vídeo do tipo super VGA, sendo armazenado sob a forma de arquivo.



FIGURA III.4. - BRAÇO MECÂNICO DE POSICIONAMENTO DAS AMOSTRAS.

De posse da matriz digital, dá-se o início da reconstrução tomográfica, fazendo uso do algoritmo computacional por retroprojeção filtrada (figura III.5).

Após a reconstrução, que pode durar de horas a dias, dependendo da resolução utilizada, dá-se início a análise das imagens obtidas. Como exemplo deste fato, tem-se que para a realização de uma reconstrução bidimensional 500x500, se gasta em média alguns minutos, já para uma reconstrução tridimensional 500x500x500, despendem-se horas.

Micro CT

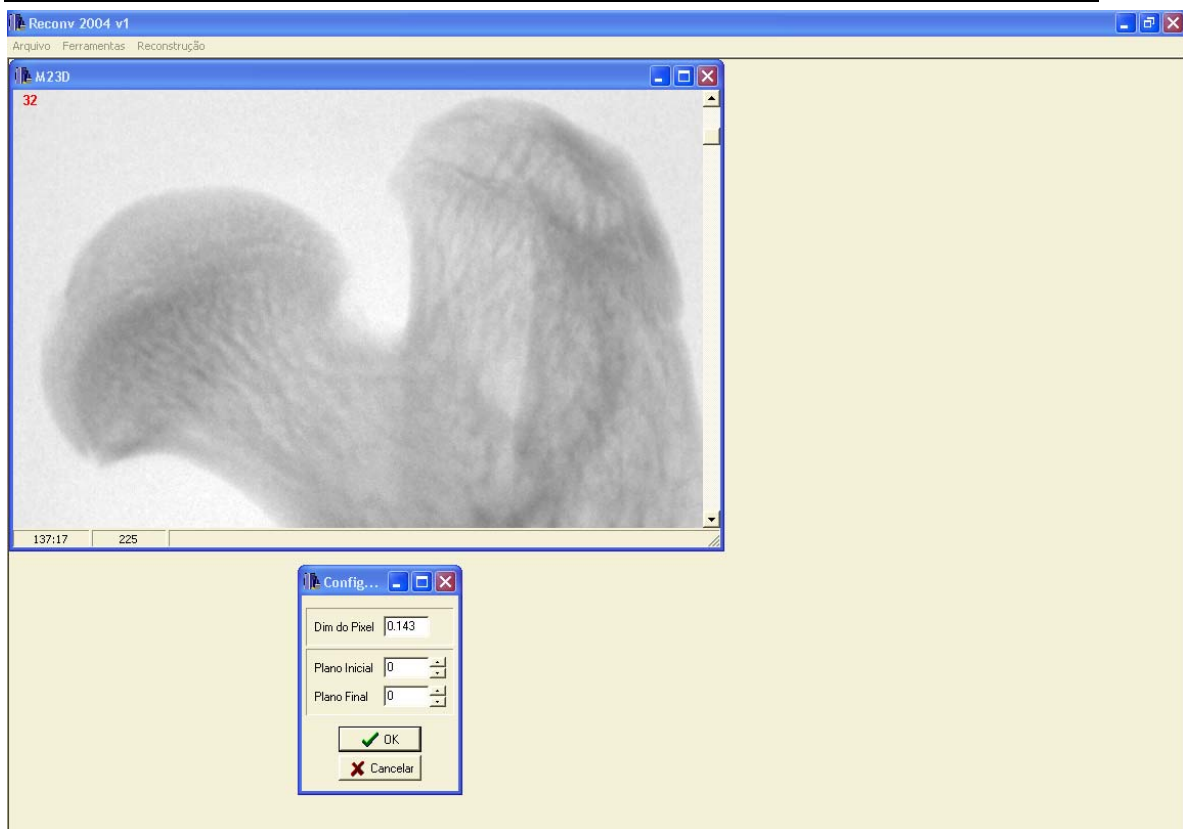


FIGURA III.5 - INTERFACE DO PROGRAMA DE RECONSTRUÇÃO.

III. 1.2. As Amostras Ósseas em Micro CT

Um ensaio preliminar foi efetuado com fêmur direito de rata Wistar doado pelo departamento de biofísica da UERJ com 120 dias de idade para verificar a possibilidade do estudo de tal estrutura. Visto que esse trabalho seria possível (de acordo com as imagens obtidas), deu-se continuidade ao mesmo com outras amostras, que foram separadas em três grupos.

1. **Grupo 1:** O primeiro grupo de amostras utilizado para fazer o ensaio microtomográfico constituiu de cinco amostras de fêmur de ratos Wistar (três machos e duas fêmeas) com 3 meses de idade. Esses animais foram doados pelo Instituto de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UFRJ. Após o sacrifício dos animais, de acordo com a Comissão de ética da Universidade, as

amostras de fêmur foram colocadas em álcool 70% e posteriormente levadas para o departamento de mastozoologia da referida instituição, para iniciar o processo de limpeza dos ossos através da utilização de larvas de besouro. Após a limpeza dos ossos, os mesmos foram submetidos ao ensaio microtomográfico, nas condições apresentadas na tabela III. 1.

2. **Grupo 2:** Um segundo grupo de animais, submetidos ao tratamento de etanol, foi investigado. São nove animais separados em dois grupos: um grupo controle (2a) em que participam dois machos e duas fêmeas e outro grupo (2b) constituído de três machos e duas fêmeas. Todas as fêmeas tinham 1 ano de idade e todos os machos 2 anos de idade. Os animais do grupo 2b receberam etanol na concentração de 10% em água durante uma semana, quando passaram a receber etanol 20% durante um período adicional de onze semanas quando o tratamento foi interrompido, e os animais começaram a receber água por 5 dias.

3. **Grupo 3:** Tem-se ainda um terceiro conjunto de amostras constituídas de biópsias humanas, com e sem patologias associadas, fornecidas pelo departamento de histologia do CCS da UFRJ.

A figura III.6 ilustra uma foto de um fêmur de rato Wistar utilizado no ensaio de MicroCT e a figura III.7 apresenta as fotos das biópsias utilizadas.

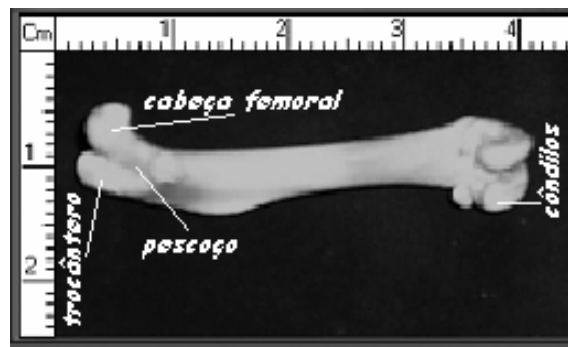


FIGURA III.6 – FOTO DE UM FÊMUR DE RATO WISTAR.

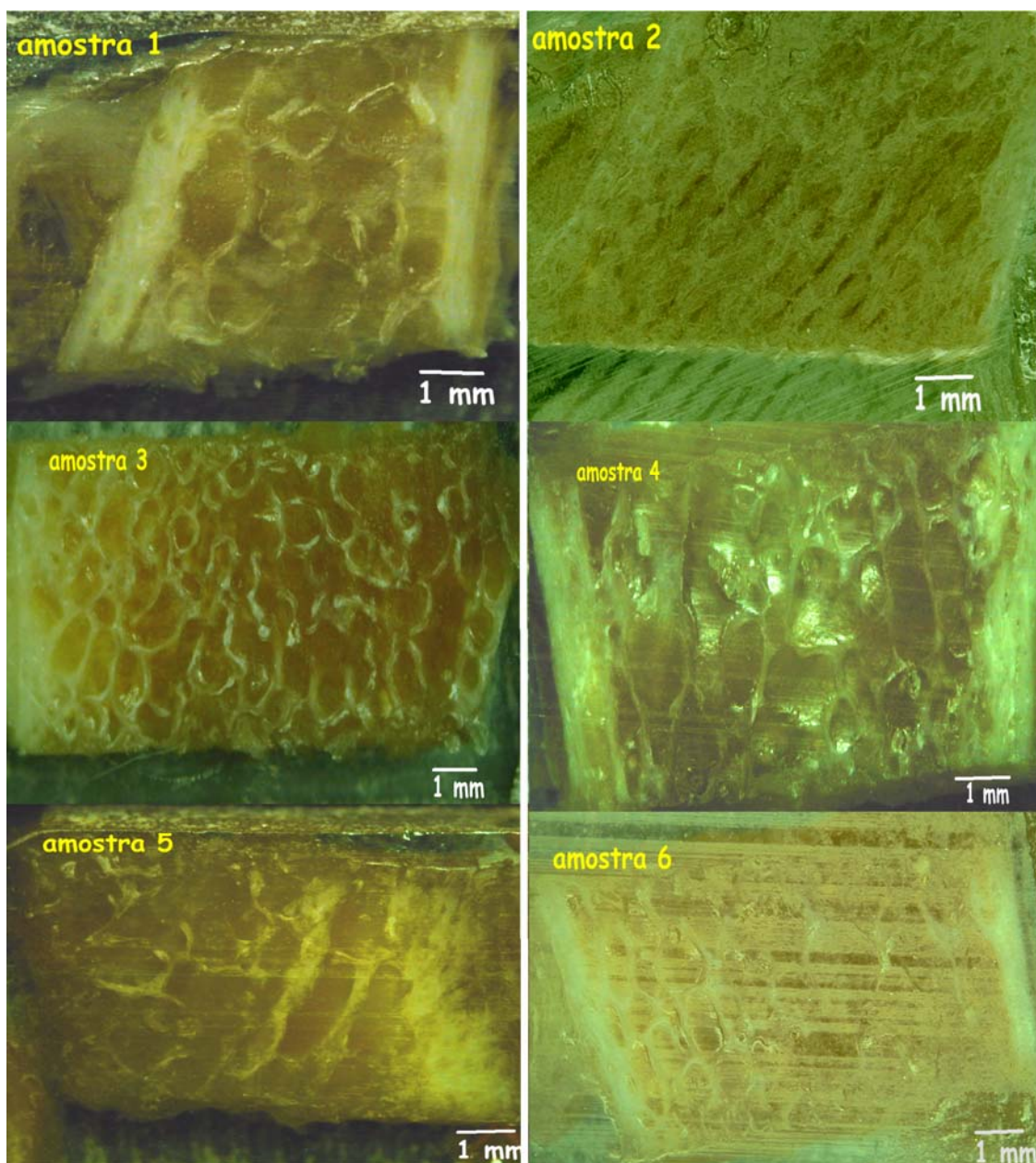


FIGURA III.7 – FOTOS DAS BIÓPSIAS ÓSSEAS UTILIZADAS NO ENSAIO DE μ CT.

III.1.3. A Aquisição das Tomografias

A tabela III.1 apresenta as condições tomográficas de todas as amostras analisadas (grupos 1, 2 e 3).

TABELA III. 1 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO ENSAIO MICROTOMOGRÁFICO.

Parâmetros	Amostras		
	1	2	3
Tensão (kV)	40	40	33 - 40
Corrente (mA)	0,1	0,1	0,1 – 0,2
Número de quadros	32	32	32
Número de projeções	600	600	600
Fator de Magnificação	11,8	13,2	4 – 12,5
Resolução (μm)	12	20	31,7 – 11,4

III.1.4. A Reconstrução das Imagens

A reconstrução das tomografias é feita conforme explicitado no capítulo anterior, item II.4.1. A figura III.8 mostra o diagrama do algoritmo utilizado.

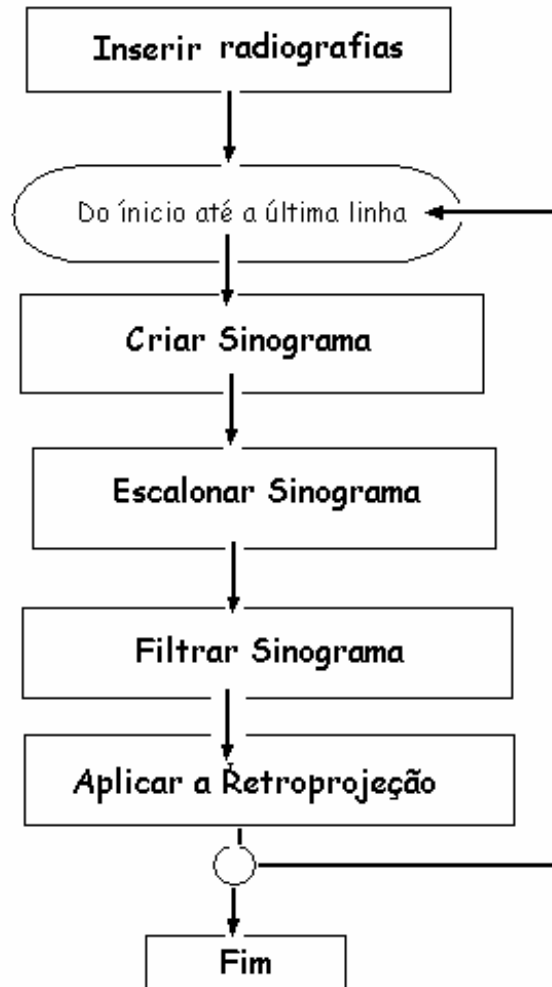


FIGURA III.8 – DIAGRAMA DO ALGORITMO DE RECONSTRUÇÃO.

A interface do programa está ilustrada na figura III.9 e os dados de entrada para a execução da reconstrução são:

- i) As imagens radiográficas (com extensão *.cfg);
- ii) A dimensão do “pixel” no detector;
- iii) A escolha dos plano inicial e final que se deseja reconstruir.

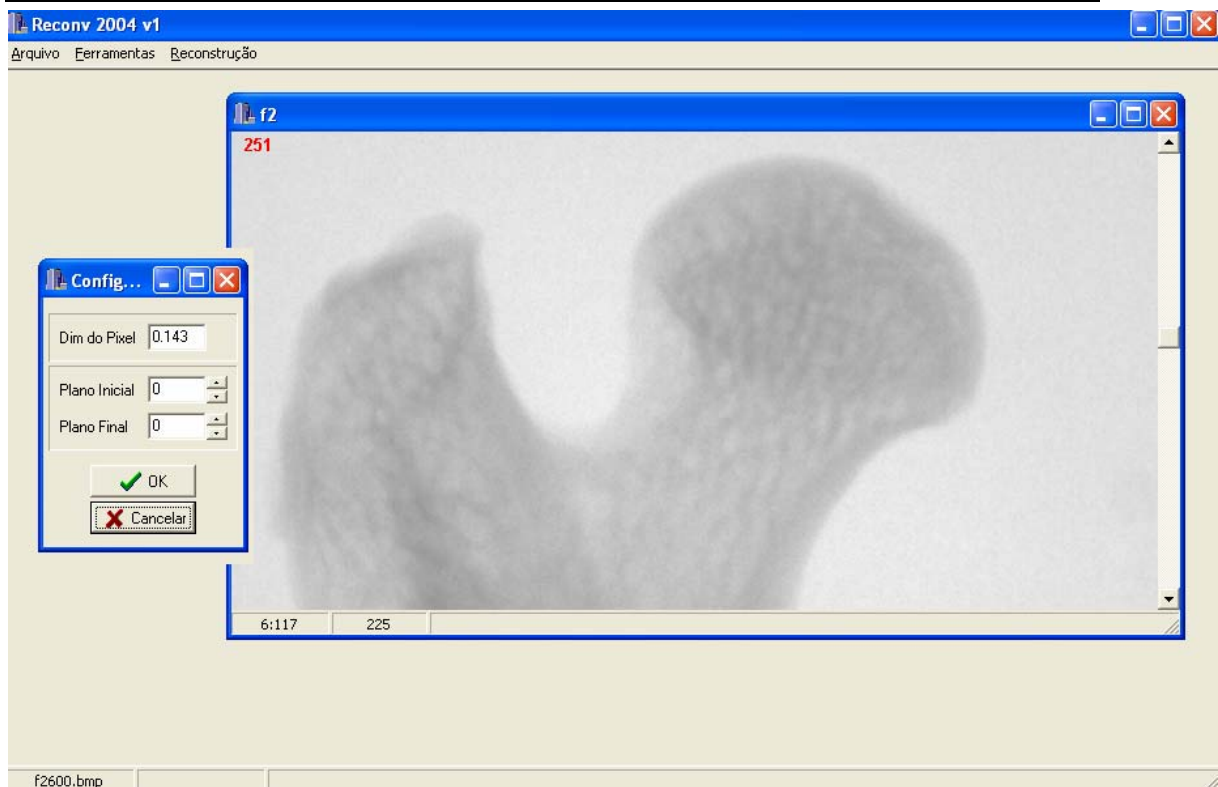


FIGURA III. 9 – INTERFACE DO PROGRAMA DE RECONSTRUÇÃO.

III.1.5. A Quantificação das Amostras Ósseas

A figura III.10 ilustra a interface do programa utilizado para fazer as quantificações ósseas e a figura III.11 mostra o diagrama do algoritmo utilizado. Os dados de entrada para que o processo seja executado são: as imagens tomográficas (com extensão *.hdr), distâncias fonte-detector e fonte-objeto e tamanho do "pixel" no detector. Com isso, tem-se automaticamente qual a magnificação utilizada na tomografia e a quantificação requerida.

A região quantificada (região de interesse – R.O.I.) é a cabeça femoral, em que se escolhe o maior retângulo circunscrito para analisar (figura III.12). Esse procedimento é padronizado para todos os "slices".

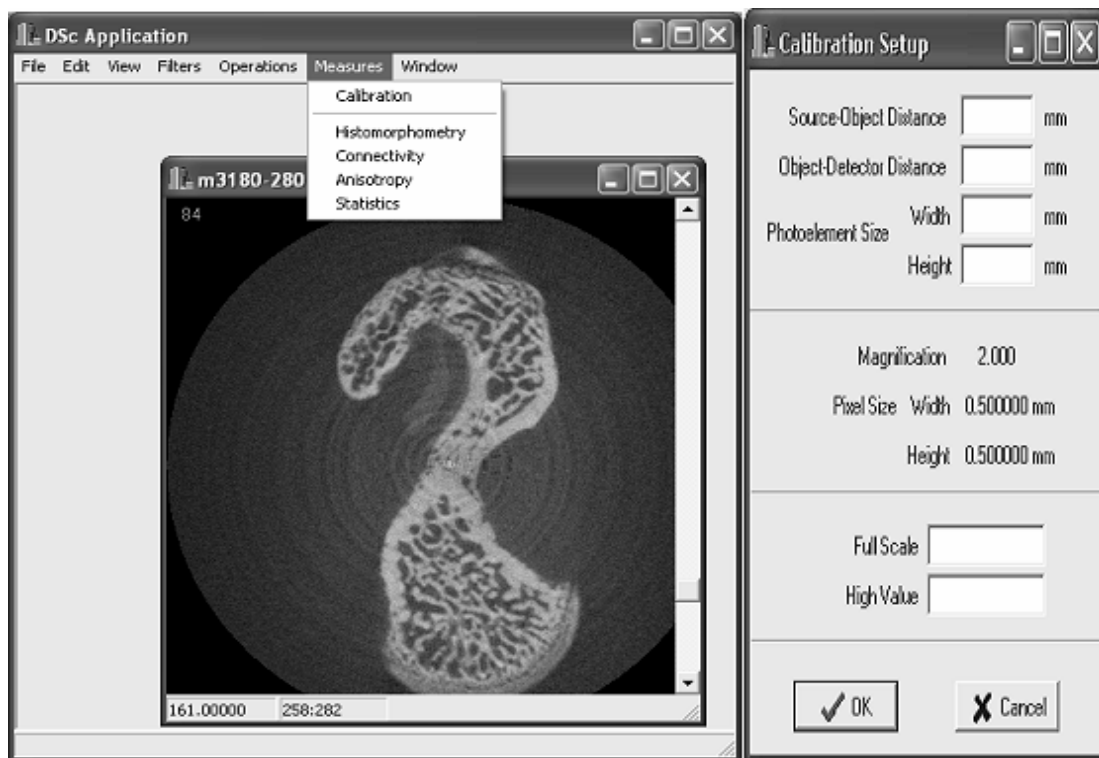


FIGURA III.10 - INTERFACE DOS DADOS DE ENTRADA FORNECIDAS PELO PROGRAMA DE QUANTIFICAÇÃO.

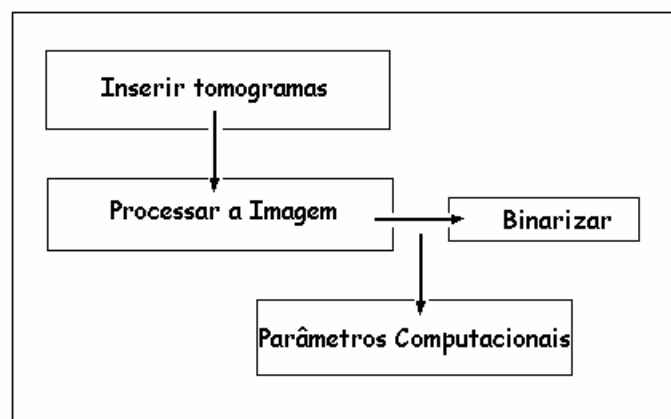


FIGURA III.11 – DIAGRAMA DO ALGORITMO DE QUANTIFICAÇÃO.

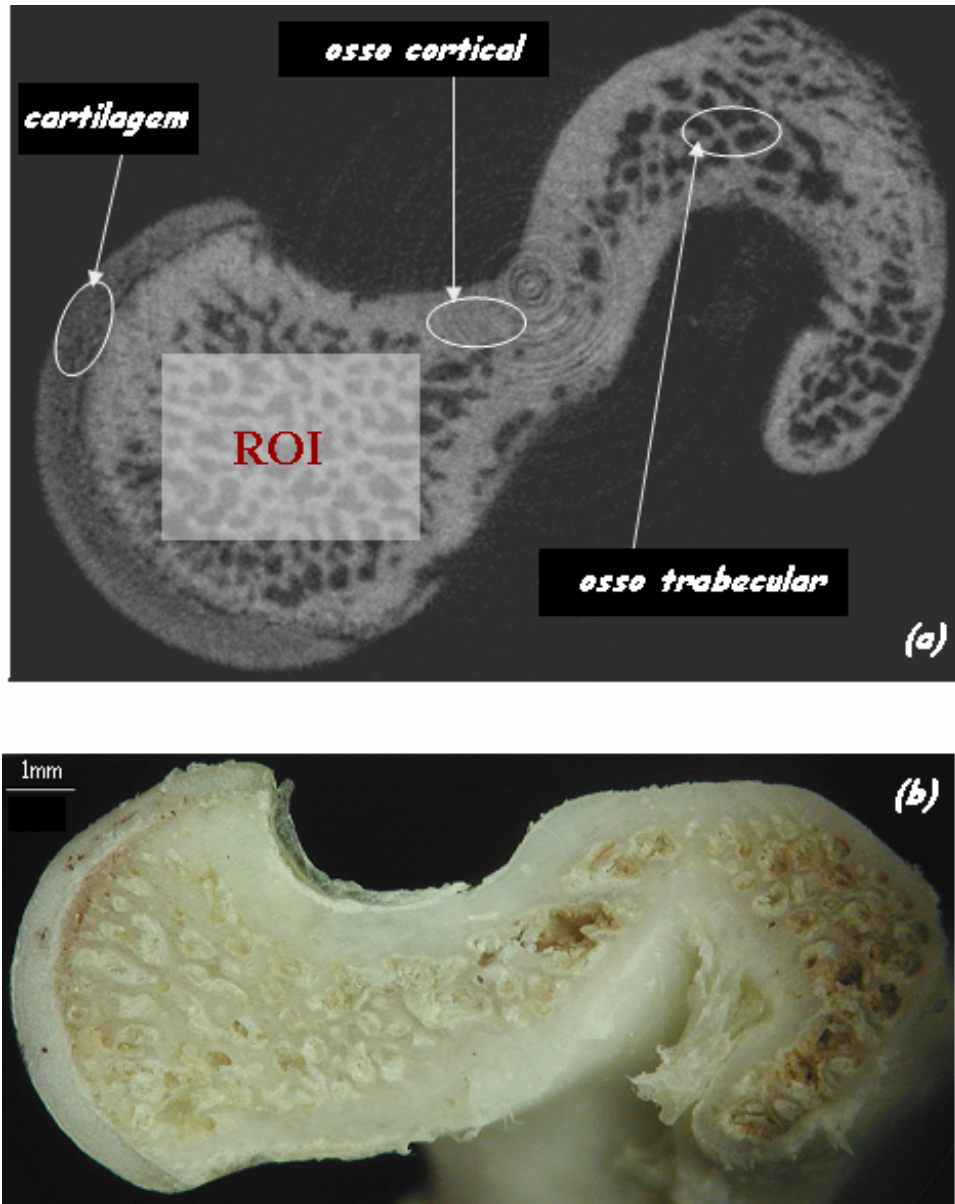


FIGURA III.12 – REPRESENTAÇÃO DA ESCOLHA DO R.O.I. (A) IMAGEM RADIOGRÁFICA DE UM OSSO DE RATO SEM PATOLOGIA ASSOCIADA COM 12 MESES DE IDADE, (B) FOTO COM 2X DE AUMENTO DE UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM 4 MESES DE IDADE.

III. 2. Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia

III.2.1. O Arranjo Experimental

A figura III.13 mostra a foto de todo o arranjo experimental, que é composto por um detector de Si-Li, um mini tubo de raios X e um porta amostras em frente ao detector. Toda a geometria do sistema é fixa e as principais características do sistema se encontram na tabela III. 2.1 e III.2.2.

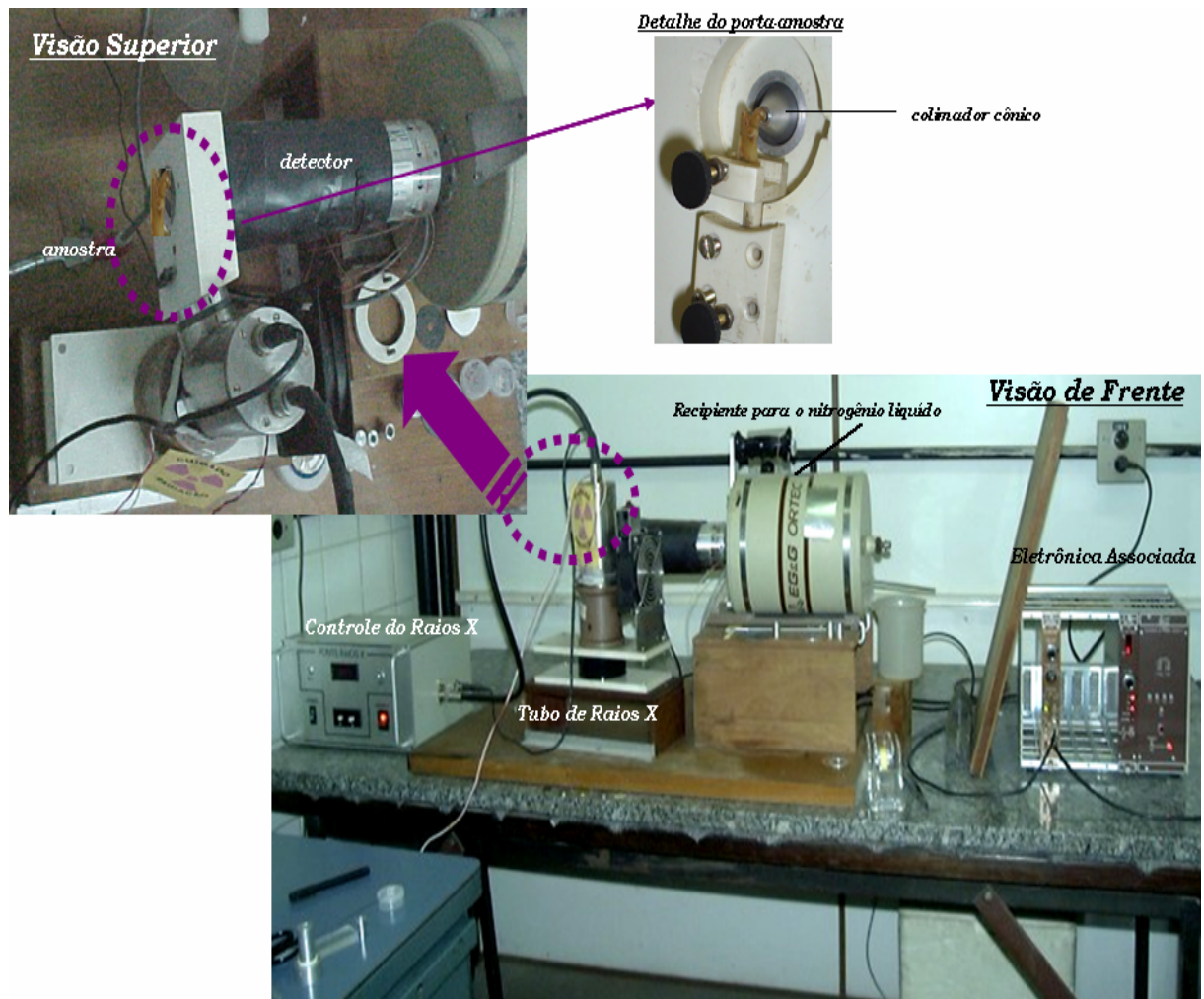


FIGURA III.13 – FOTO DO ARRANJO EXPERIMENTAL DE EDXRF.

TABELA III.2 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO SISTEMA UTILIZADO PARA EDXRF.

ELEMENTOS	CARACTERÍSTICAS
Detector	Si-Li, Ortec.
Tube de Raios X	Mini tubo, tensão: 0 - 65kV, Corrente: 0 - 0,77mA. Ânodo de W.
Fonte de Raios X	XRM-65P50
Eletrônica	Amplificador Ortec, modelo 973 e serie 126; Fonte de alta tensão Ortec, modelo 659 e série 1060; Bin Ortec, modelo 4001M e série 1294.
Placa Multicanal	Ortec-Maestro II

TABELA III.3 - CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DO SISTEMA DE EDXRF.

PARÂMETROS	DESCRIÇÃO
Tensão (kV)	35
Corrente (μ A)	750
Ângulo de Incidente	16° em relação à superfície da amostra
Ângulo Emergente	90° em relação à superfície da amostra
Distância Amostra Detector (mm)	3,5 \pm 0,1
Distância Fonte Detector (mm)	7,6 \pm 0,1
Diâmetro do Colimador Cônico (mm) (*)	2,0 \pm 0,1

(*) O colimador é utilizado para evitar o múltiplo espalhamento e a produção de linhas de raios X característica de materiais do arranjo experimental ou próximo dele.

III. 2.2. As Amostras em EDXRF

As amostras que foram analisadas com auxílio dessa técnica foram as provenientes dos grupos 1 e 2 especificadas no item III.1.2 desse capítulo, sem nenhum tratamento posterior. As regiões analisadas foram a cabeça e o

pescoço femorais e os condilos. Todas as amostras foram irradiadas por 1500 segundos.

III. 2.3. Avaliação da Metodologia utilizada em EDXRF

Para avaliar as medidas realizadas, foi feita uma medida de um osso-referência (amostra padronizada – figura III.14), irradiada na mesma condição das amostras ósseas. É importante falar sobre a geometria do molde, pois essa tem que obedecer (o mais fielmente possível) a geometria do fêmur. Esse osso-referência é feito em molde de gesso, tendo sua cavidade preenchida com uma mistura constituída por:

1. Polímero metil-metacrilato (massa igual a 2553,6 mg);
2. Resina (massa igual a 830,7 mg);
3. Elementos (que *a priori* não se encontram na amostra de fêmur) com concentrações conhecidas;
4. Osso seco (osso colocado em estufa a 70 por 30 minutos aproximadamente), triturado em mortar de gata e peneirado em três etapas: peneira com abertura de 125, 75 e 45 mm;



FIGURA III.14 – FOTO DA AMOSTRA DE REFERÊNCIA.

III. 2.4. Calibração do Sistema

A curva de sensibilidade é determinada experimentalmente através de medidas de intensidade da radiação fluorescente de um elemento i nos padrões (figura III.15). Os padrões utilizados (doze no total, descritos na tabela III.4) constituem pastilhas de um único elemento ou de óxidos, e suas escolhas estão relacionadas com o intervalo de energia que se deseja trabalhar. Com isso determina-se uma curva de sensibilidade para o sistema em uso. Uma vez tendo essa curva de sensibilidade experimental têm-se os valores de sensibilidade para quaisquer outros elementos, fazendo uma interpolação na curva experimental. Tem-se, portanto um levantamento semi-empírico da sensibilidade para os elementos presentes na amostra óssea.

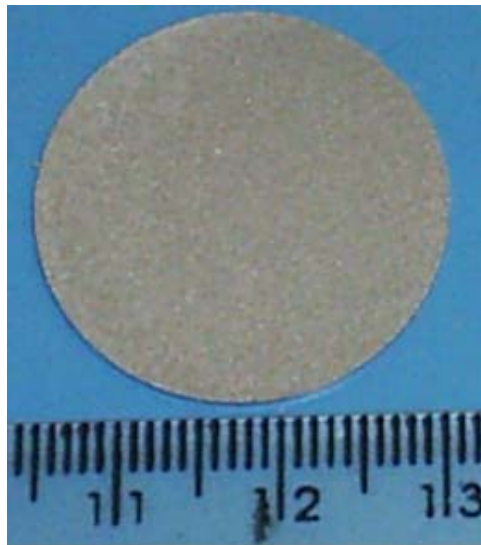


FIGURA III. 15 – FOTO DE UM EXEMPLO DE UM PADRÃO, UTILIZADO NO LEVANTAMENTO DA CURVA DE SENSIBILIDADE.

TABELA III.4 – INFORMAÇÕES SOBRE OS PADRÕES UTILIZADOS NA CALIBRAÇÃO DO SISTEMA.

Elementos/Óxidos	Massa do composto (mg)	Massa total* (mg)	Concentração do elemento (%)	E _K (keV)
K ₂ SO ₄	100,4	528,2	8,2	2,62
CaO	99,8	470,5	14,3	3,69
TiO ₂	49,9	473,5	6,0	4,51
Mn ₂ O ₃	49,7	473,2	6,9	5,90
Co	51,0	476,2	10,2	6,93
Ni	49,8	451,2	10,0	7,47
Cu	51,0	471,9	10,2	8,04
ZnO	49,6	483,4	8,0	8,63
RbNO ₃	50,1	476,0	5,8	13,38
N ₂ O ₆ Sr	49,9	470,6	4,1	14,14
Y ₂ O ₃	10,5	479,4	1,6	14,93
ZrO ₂	9,7	470,9	1,4	15,75
Ag	50,8	533,3	9,2	22,10

* massa total representa a massa do composto adicionado a massa de ácido bórico (H₃BO₃) para ter resistência mecânica da matriz e diminuir o coeficiente de absorção da amostra reduzindo o efeito matriz

III.2.5. O fator Absorção

O termo de absorção é calculado conforme a equação XVIII. Na equação XIX. $\mu_M(E_i)$ é determinado pelo Método da Transmissão da Radiação, explicitado no capítulo anterior, seção II. 6.1.2. Já o coeficiente $\mu_M(E_o)$ é calculado com auxílio da equação XXVI [132]:

$$\mu_M(E_o) = -\frac{1}{\rho D} \ln \left\{ \sum_{j=1}^n \left[\left(\frac{I_j}{I_o} \right) \exp(-\mu(E_j)\rho D) \right] \right\} \quad (\text{XXVI}).$$

Com todos os dados previamente descritos na seção II. 6.1.2. As medidas de transmissão da radiação foram feitas através da radiação fluorescente produzida em um alvo multielementar e, da radiação gama e raios X emitidos por uma fonte de Am-241 (não selada), cujas especificações se encontram na tabela III.5.

TABELA III. 5 – ESPECIFICAÇÕES DO ALVO MULTIELEMENTAR E DA FONTE DE AM-241.

Amostra	Elementos	Energia (keV)
Alvo	Cu	8,05
	Mn	5,90
	Ti	4,51
	Sr	14,16
Fonte de Am-241	-	13,95
	-	17,76
	-	22,13
	-	26,36

III.2.6. Análise dos Espectros e Limite de Detecção

Utilizou-se o programa AXIL (“Analysis of X-ray Spectra by Iterative Least Squares Fitting”) para fazer as análises dos espectros obtidos.

O programa AXIL foi desenvolvido por Van Espen *et al* [139]. Sua linguagem computacional é o FORTRAN sem nenhuma dificuldade de utilização. Esse programa requer que todos os dados espectrais estejam em um formato particular (estruturados em blocos de arquivos ASCII) e a extensão desses arquivos devem ser *.SPE e, portanto, o primeiro passo para analisar os espectros deve ser sua conversão. A figura III.16 apresenta a interface para a situação explicitada, enquanto a figura III.17 exhibe um exemplo de um espectro.

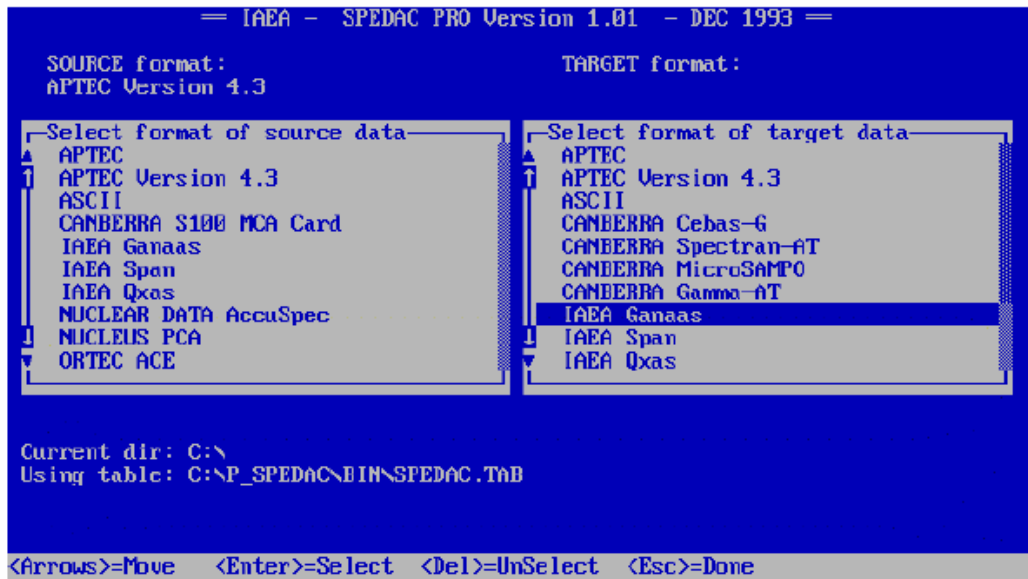


FIGURA III.16 – INTERFACE DO PROGRAMA AXIL: UM DOS PASSOS REQUERIDOS PARA PROCEDER A CONVERSÃO DOS ESPECTROS.

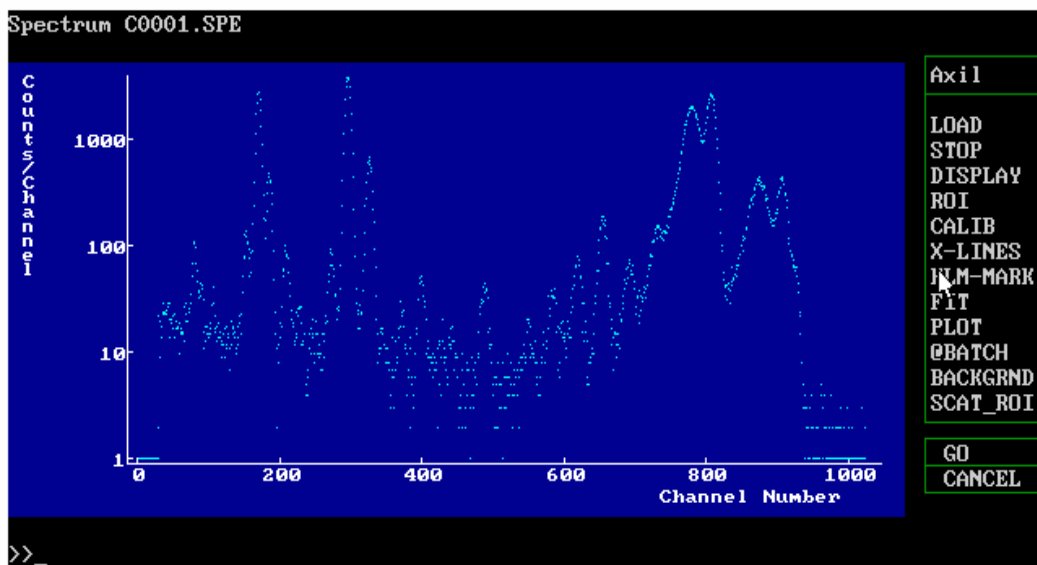


FIGURA III.17 – EXEMPLO DE UM ESPECTRO JÁ CONVERTIDO EM EXTENSÃO *.SPE.

Após a conversão dos espectros é necessário avaliá-los ajustando-os a funções matemáticas, através do método dos mínimos quadrados. Um exemplo desse procedimento é apresentado na figura III.18.

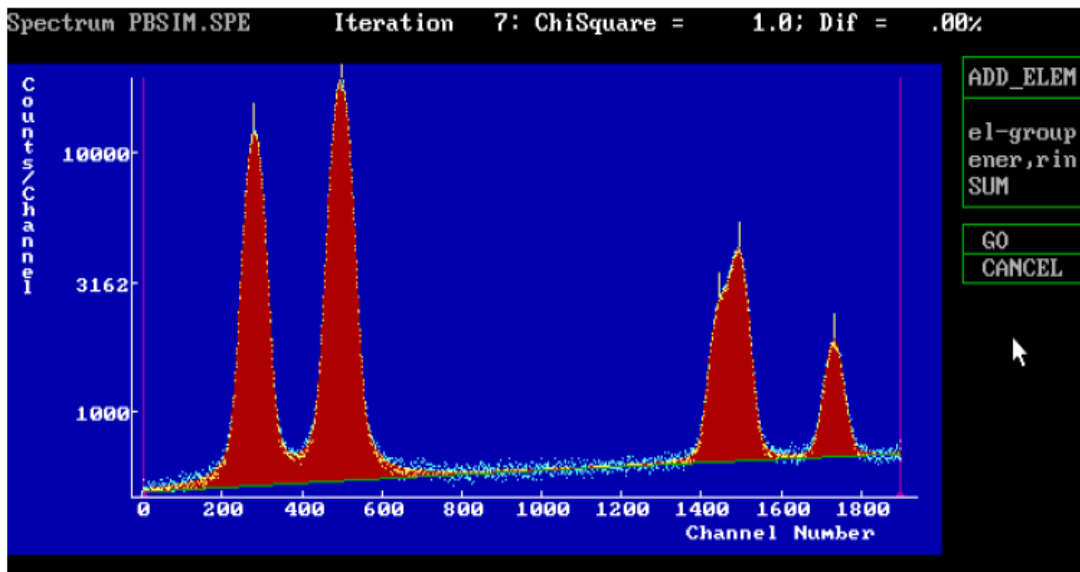


FIGURA III.18 – EXEMPLO DE UM ESPECTRO AJUSTADO.

O Limite de Detecção foi calculado conforme explicitado no capítulo II, seção II.6.1.3, equação XXVI.

III.2.7. Cálculo das Concentrações Elementares

O cálculo das concentrações elementares é obtido através da equação XX, seção II.4.2. Esse cálculo pode ser feito manualmente ou através de um programa desenvolvido no laboratório, já testado com amostras padrões e certificadas. A figura III.19 mostra a interface do mesmo. Os dados de entrada são:

- i) o espectro de raios X;
- ii) A sensibilidade das linhas K e L;
- iii) a medida da intensidade incidente (alvo);
- iv) a medida da intensidade transmitida (alvo+amostra);
- v) densidade superficial da amostra;
- vi) fator de diluição da amostra;

vii) informações sobre a geometria do sistema (ângulos de incidência e de emergência da radiação).

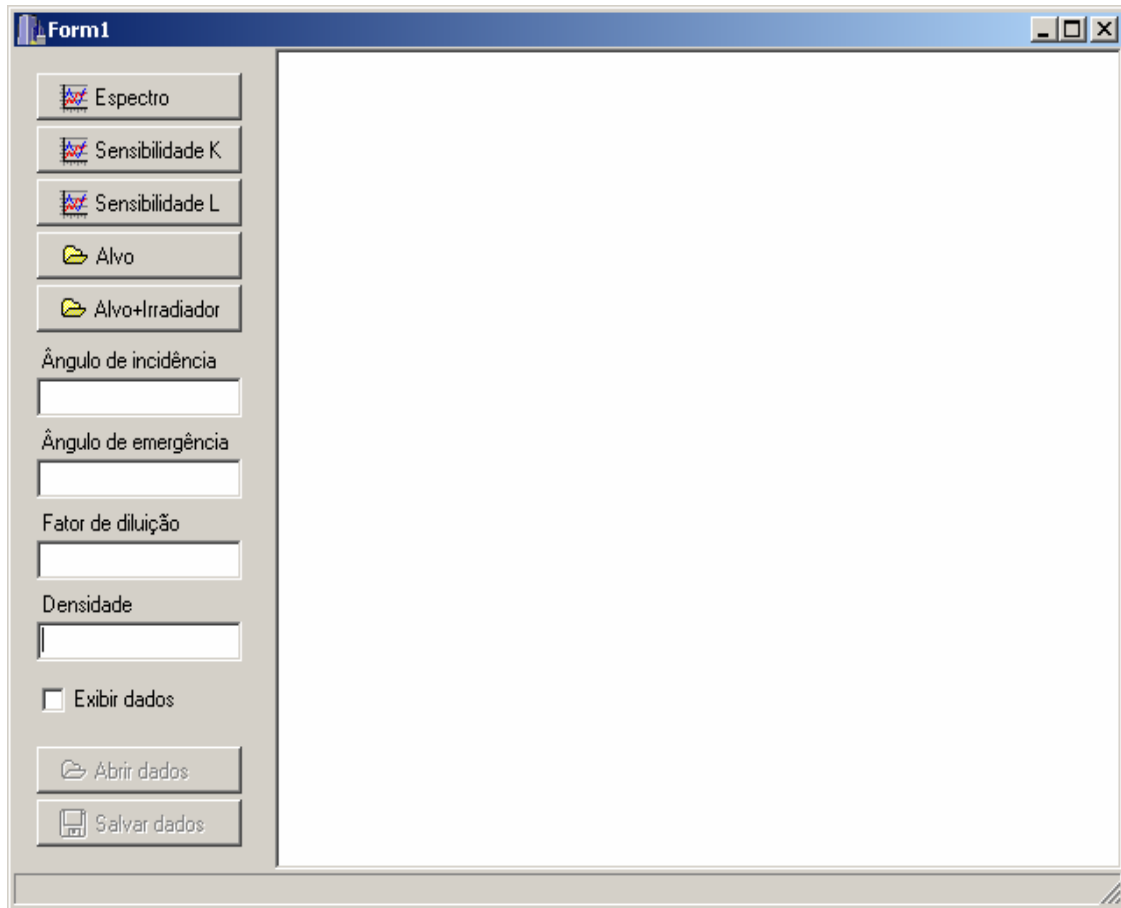


FIGURA III.19 – INTERFACE DO PROGRAMA DE QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ELEMENTAR.

III. 3. Micro XRF-SR

III.3.1. O Arranjo Experimental

A figura III.20 exibe uma visão geral de todo o anel e a disposição de algumas linhas de luz no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas, São Paulo – onde foram efetuadas as medidas de μ XRF-SR. Já a figura III.21 ilustra um detalhe da instrumentação requerida para o levantamento das medidas e a figura III.22 seu arranjo esquemático. O tempo de contagem por ponto variou, conforme o tamanho das amostras, desde 9 a 25 s.

As características da Linha XRF, no momento das medidas, se encontram na tabela III.3.1.



FIGURA III. 20 – VISTA PANORÂMICA DO ANEL NO LNLS.

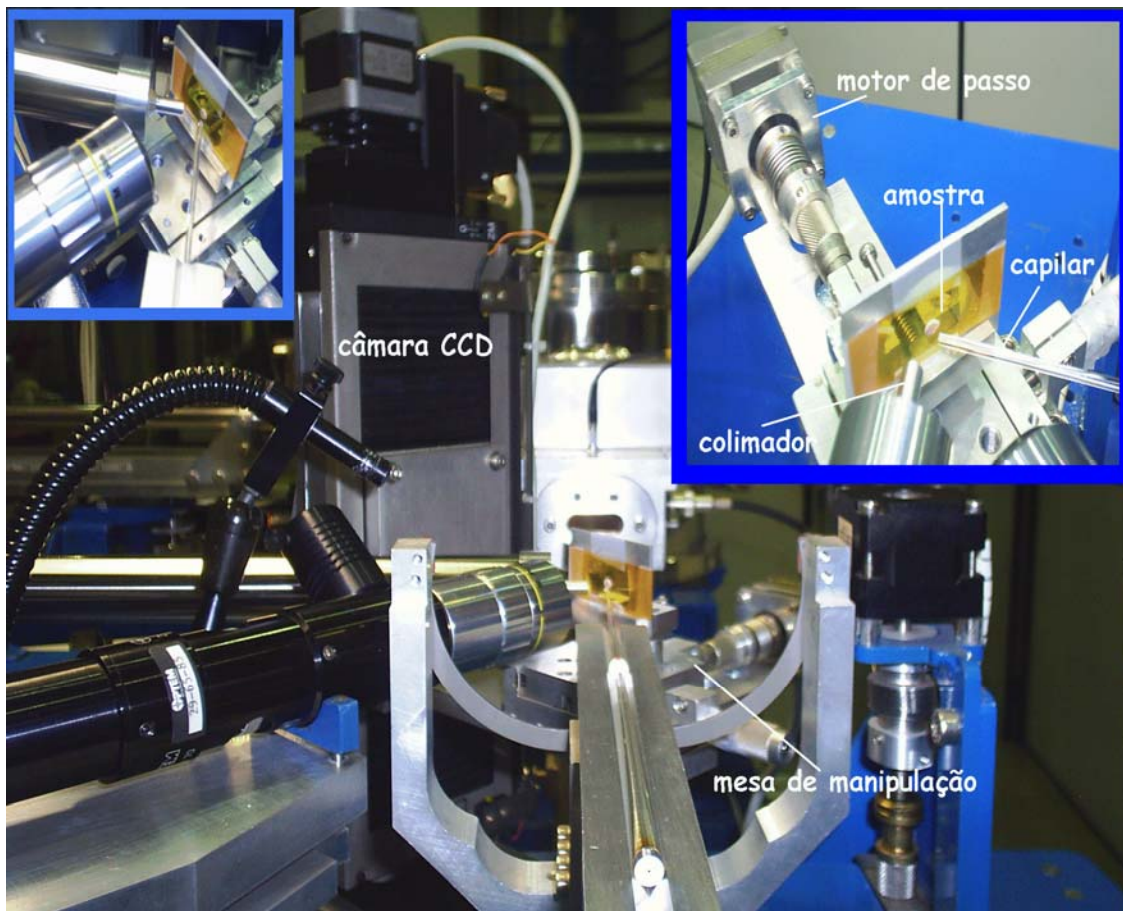


FIGURA III. 21 – DETALHE DA INSTRUMENTAÇÃO NA LINHA XRF.

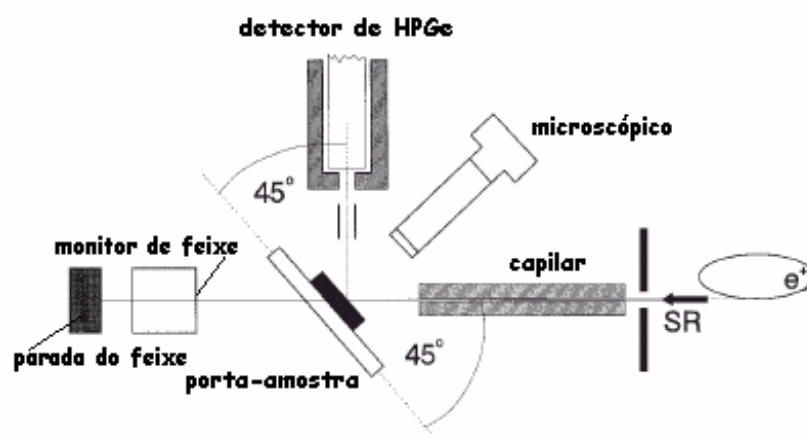


FIGURA III.22 – ESQUEMA DO ARRANJO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA μXRF-SR.

TABELA III. 6 – CARACTERÍSTICAS DA LINHA XRF (4 - 23 keV).

Equipamentos	Características
Fonte	Ímã defletor D09B(15°); fluxo na amostra é de 4×10^9 fótons. s^{-1} , a 8keV.
Feixe	Luz branca
Monocromador	“Channel-cut”
Cristais	Si (111): ($2d=6,22 \text{ \AA}$): 4 - 14 keV ($E/\Delta E=2800$); Si (221): ($2d=3,84 \text{ \AA}$): 5 - 23 keV ($E/\Delta E=15000$).
Detector	Germânio hiperpuro (HPGe), resolução de 150 eV em 5,9 keV.
Geometria	$45^\circ / 45^\circ$: O suporte é posicionado a 45° em relação ao detector e ao feixe incidente.
Óptica	Capilar com $20\mu\text{m}$ de diâmetro.

III. 3.2. As Amostras

As amostras que foram analisadas com auxílio dessa técnica foram provenientes também do CCS, mas que não haviam sido analisadas por μCT , e será denominada como grupo 4, especificadas a seguir.

Grupo 4: Para dar continuidade ao fornecimento das amostras e almejar alcançar o objetivo desse trabalho foi desenvolvida uma colaboração com o Instituto de Biofísica - Departamento de Fisiologia Endócrina e com o Hospital Universitário. Com isso, foi possível a obtenção de um conjunto de animais de estudo, constituído de 10 animais fêmeas, com 4 meses de idade divididos em três subgrupos: grupo com cinco animais controle (4a), grupo com cinco animais ovariectomizados (4b) e grupo com cinco ratas ovariectomizadas porém submetidas a uma reposição de estrogênio (4c). Após o

sacrifício dos animais, aprovado pela Comissão da Instituição sob o protocolo no. 14, as amostras foram colocadas em álcool 70 % e em seguida procedeu-se à limpeza das mesmas com um bisturi sem danificar a estrutura óssea até todo o excesso de material fosse completamente retirado.

A região analisada foi a cabeça femoral (tanto a parte cortical quanto a trabecular), sendo as mesmas cortadas com auxílio de uma lâmina de diamante na espessura mais fina possível (da ordem de 300 micrometros). Um exemplo de amostra pode ser visualizado na figura III. 23.

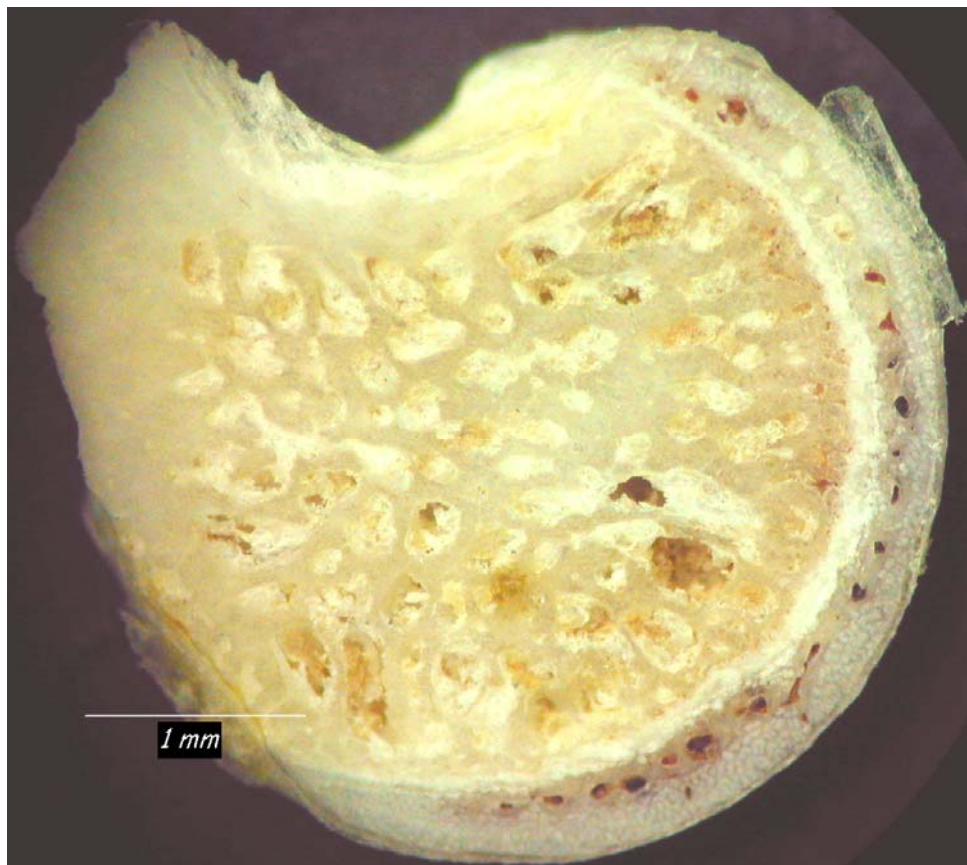


FIGURA III. 23 – FOTO DE UMA AMOSTRA.

III. 3.3. Calibração do Sistema

A curva de sensibilidade é determinada experimentalmente através de medidas de intensidade da radiação fluorescente de um elemento i nos padrões, similarmente ao ocorrido na seção III.2.3. As informações sobre os padrões utilizados se encontram na tabela III. 3.2.

TABELA III.7 – INFORMAÇÕES SOBRE OS PADRÕES UTILIZADOS NA CALIBRAÇÃO DO SISTEMA.

Elementos/Óxidos	Massa composto ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	Massa elemento ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	E_K (keV)
SiO	45,6	29,1	1,74
KCl	46,9	24,6	2,62
CaF ₂	47,7	24,5	3,69
Ti	---	39,4	4,51
V	---	42,2	4,95
Cr	---	42,6	5,41
Mn	---	47,7	5,90
Fe	---	46,1	6,40
Co	---	50,7	6,93
Ni	---	43,1	7,48
Cu	---	46,5	8,05
ZnTe	46,1	15,6	8,64
Se	---	42,5	11,22
SrF ₂	44,7	31,2	14,16
YF ₃	50,8	31,0	14,96
NbO ₃	45,8	36,4	16,61

O fator de absorção e a análise dos espectros foram obtidos através dos processos já explicitados nas seções III. 2.5 e III.2.6 desse capítulo, respectivamente, assim como o limite de detecção.

III.3.4. Cálculo das Concentrações Elementares e Visualização das Imagens

O cálculo das concentrações elementares é obtido através da equação XX, seção II.4.2. Já a visualização das imagens é feita através de um programa de imagens, desenvolvido no laboratório. Esse programa pode fazer as visualizações tanto na escala de intensidade relativa quanto na de concentração, dependendo dos dados de entrada. Um outro dado importante para a visualização das imagens é o tamanho da matriz inspecionada. Esse tamanho de matriz está relacionado com quantidade de pontos, por medida, que foi utilizado (seção II.6.2). O mapeamento bidimensional contém todos os elementos químicos presentes na amostra analisada e é representado por cores, cuja magnitude está diretamente relacionada ao parâmetro de entrada utilizado (concentração ou intensidade relativa). A visualização 2D dos elementos é de grande auxílio para o entendimento de como os mesmos se distribuem externamente nas amostras analisadas, subsidiando principalmente no esclarecimento de patologias no que diz respeito ao incorporamento de certos minerais à estrutura óssea estudada, tal como a osteoporose.

O próximo capítulo exibirá os resultados obtidos através da metodologia aqui apresentada.

CAPÍTULO IV

IV. Resultados

Nesse capítulo serão apresentados os resultados obtidos na investigação óssea através das técnicas de microtomografia e fluorescência de raios X.

IV. 1. Micro CT

IV.1.1 – Grupo 1 (animais machos e fêmeas controle com 3 meses de idade)

As tabelas IV.1, IV.2 e IV.3 fornecem os resultados das áreas utilizadas e das quantificações ósseas para o primeiro grupo (ratos machos e fêmeas com 3 meses de idade) de amostras estudadas. Os parâmetros a e B correspondem aos semi-eixos maiores e menores, respectivamente, das elipses apresentadas.

TABELA IV.1 – VALORES DAS ÁREAS QUANTIFICADAS PARA OS RATOS COM 3 MESES DE IDADE

Amostra	1	2	3	4	5	6
Área (mm²)	2,7	2,3	2,6	2,5	3,0	2,4

TABELA IV.2 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA 2D PARA OS RATOS COM 3 MESES DE IDADE.

Parâmetros	Fêmeas (3 meses)	Machos (3 meses)
BV/TV (%)	56,8 ± 2,4	61,7 ± 3,1
BS/BV (mm⁻¹)	48,9 ± 2,0	41,3 ± 1,8 ^a
TbTh (mm)	0,042 ± 0,002	0,049 ± 0,002 ^a
TbN (mm⁻¹)	13,9 ± 0,5	12,7 ± 1,1
TbSp (mm)	0,032 ± 0,003	0,032 ± 0,005

Todos os valores estão representados como média ± desvio padrão.

^a Estatisticamente significativo em relação ao sexo, com $\alpha=0,05$.

TABELA IV.3 – RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA 3D PARA OS RATOS COM 3 MESES DE IDADE.

Parâmetros	Fêmeas (3 meses)	Machos (3 meses)
BV/TV (%)	49,1 ± 2,1	55,0 ± 2,8 ^a
BS/BV (mm ⁻¹)	43,3 ± 2,1	34,0 ± 2,2 ^a
TbTh (mm)	0,046 ± 0,002	0,059 ± 0,004 ^a
TbN (mm ⁻¹)	10,6 ± 0,7	9,4 ± 1,1
TbSp (mm)	0,046 ± 0,002	0,042 ± 0,006
BV (mm ³)	1,06 ± 0,08	1,76 ± 0,09 ^a
BS (mm ²)	45,8 ± 5,8	59,8 ± 0,7 ^a
TV (mm ³)	0,015 ± 0,001	0,023 ± 0,002 ^a

Todos os valores estão representados como média ± desvio padrão.

^a Estatisticamente significativo em relação ao sexo, com $\alpha=0,05$.

As figuras IV.1 e IV.2 fornecem os resultados da anisotropia desse grupo.

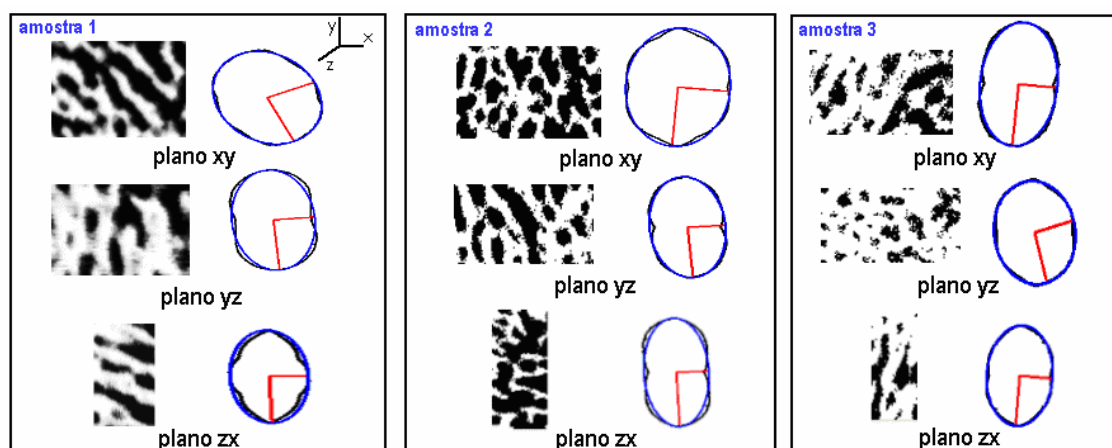


FIGURA IV.1 – RESULTADO DA ANISOTROPIA –FÊMEAS COM 3 MESES DE IDADE.

TABELA IV.4 – RESULTADOS DOS PARÂMETROS ANISOTRÓPICOS PARA OS ANIMAIS COM 3 MESES DE IDADE.

Planos	Amostras					
	Fêmeas			Machos		
	1	2	3	1	2	3
xy	A/B= 1,3	A/B= 1,3	A/B= 1,7	A/B= 1,3	A/B= 1,2	A/B= 1,2
	$\theta = -65,9$	$\theta = 84,7$	$\theta = 84,4$	$\theta = 82,8$	$\theta = -84,0$	$\theta = -78,6$
yz	A/B= 1,5	A/B= 1,9	A/B= 1,1	A/B= 1,4	A/B= 1,6	A/B= 2,0
	$\theta = -84,4$	$\theta = -85,7$	$\theta = -74,5$	$\theta = -86,7$	$\theta = -82,2$	$\theta = 89,6$
zx	A/B= 2,3	A/B= 2,0	A/B=1,4	A/B= 1,4	A/B= 1,1	A/B= 1,4
	$\theta = -88,1$	$\theta = -87,0$	$\theta = 85,1$	$\theta = -76,3$	$\theta = 65,0$	$\theta = 83,2$

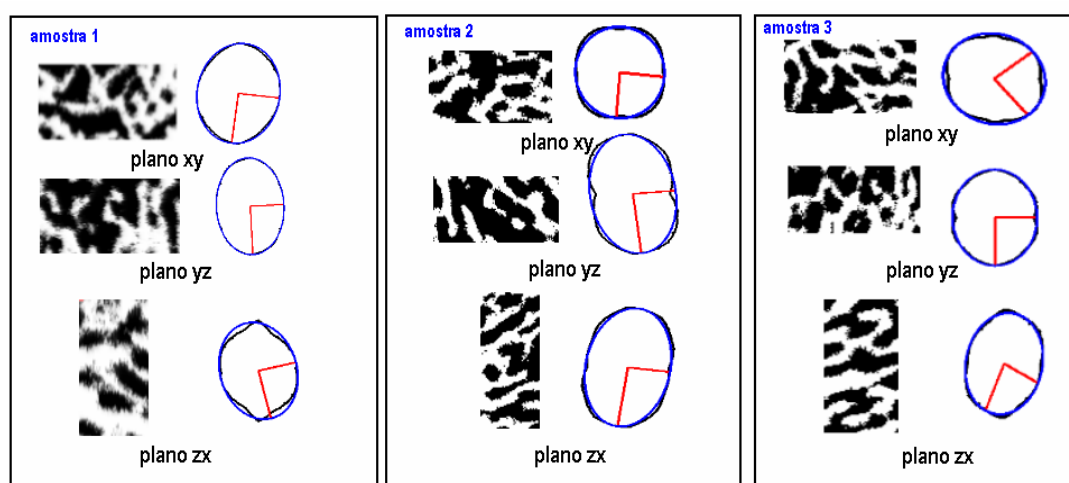


FIGURA IV.2 – RESULTADO DA ANISOTROPIA –MACHOS COM 3 MESES DE IDADE.

As figuras IV.3 e IV.4 fornecem as visualizações 2D (exemplos de “slices”) desse grupo. Enquanto, que as figuras IV.5 e IV.6 mostram as visualizações 3D das áreas que foram quantificadas.

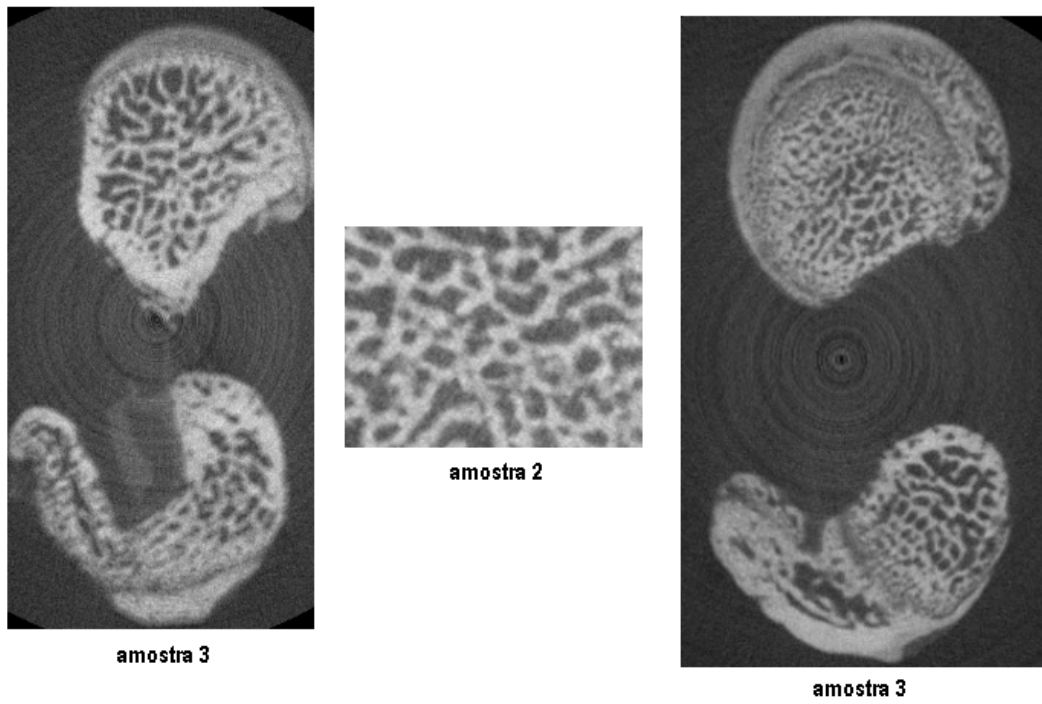


FIGURA IV.3 – VISUALIZAÇÕES 2D – FÊMEAS COM 3 MESES DE IDADE.

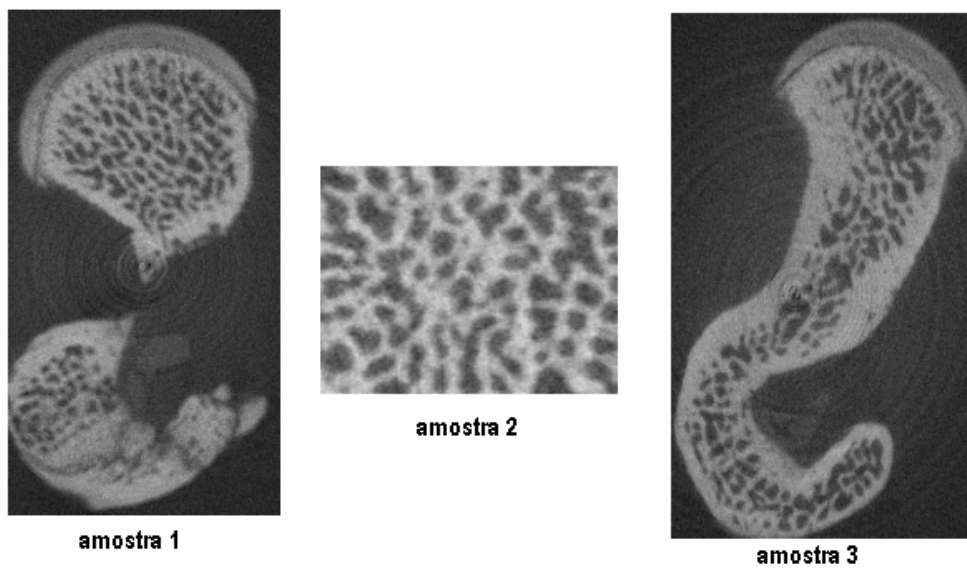


FIGURA IV.4 – VISUALIZAÇÕES 2D – MACHOS COM 3 MESES DE IDADE.

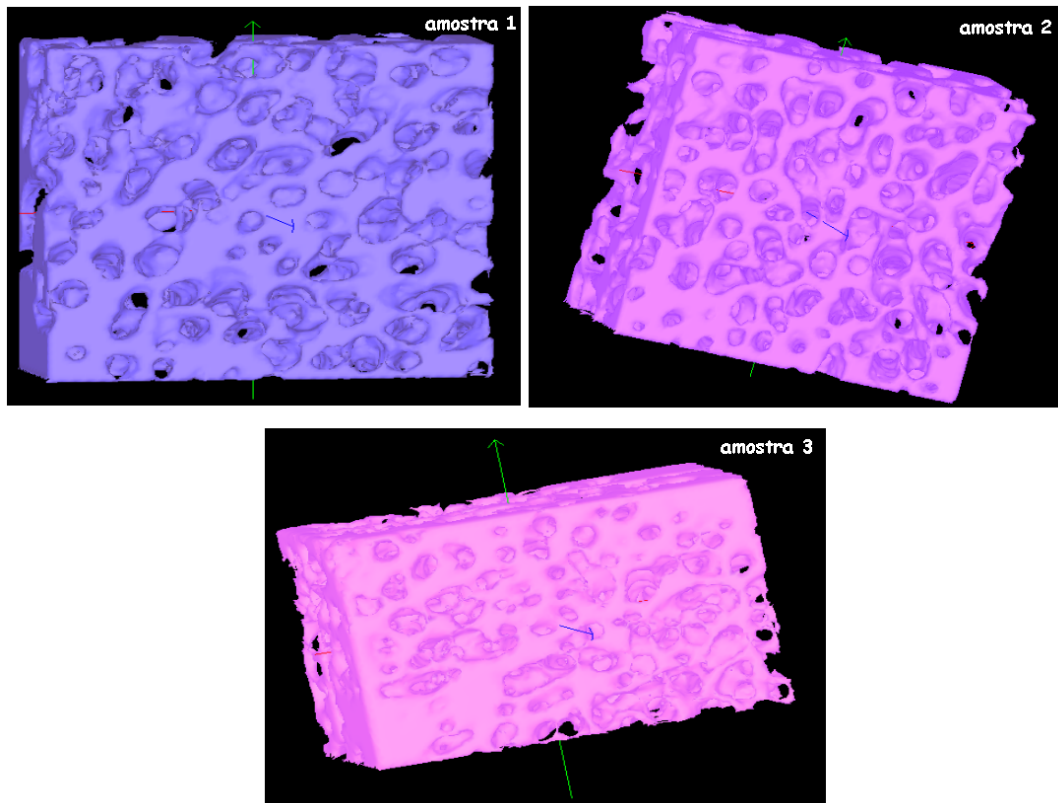


FIGURA IV.5 – VISUALIZAÇÕES 3D – FÊMEAS COM 3 MESES DE IDADE.

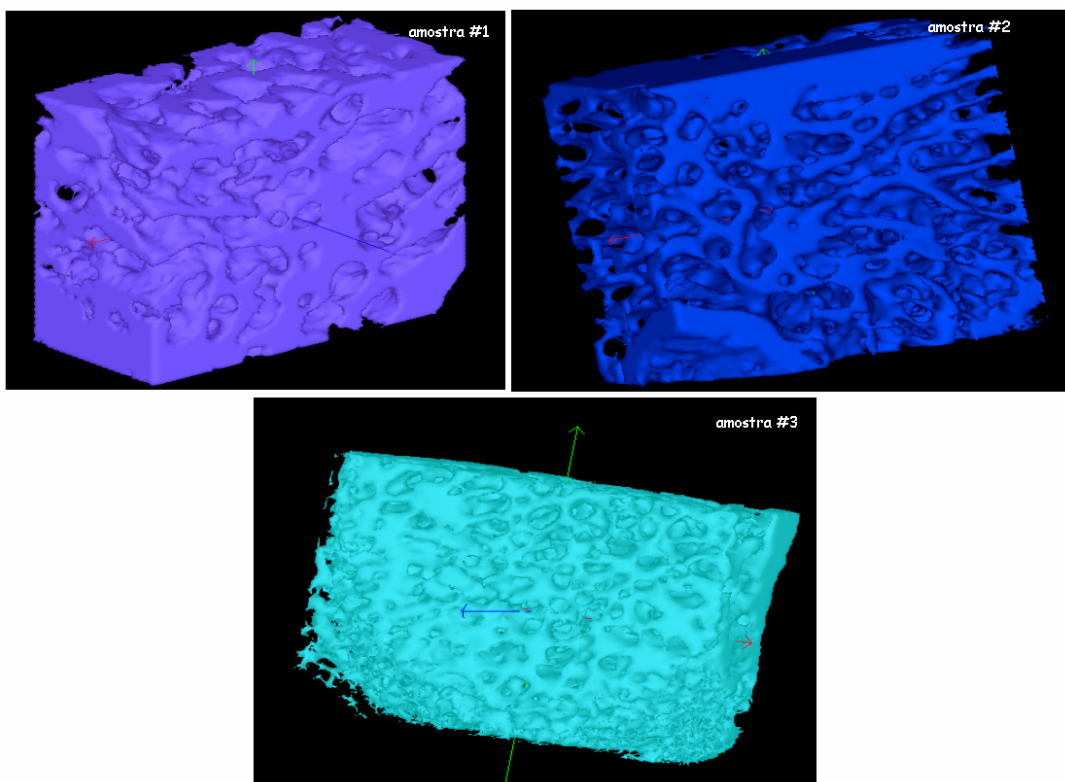


FIGURA IV.6 – VISUALIZAÇÕES 3D – MACHOS COM 3 MESES DE IDADE.

IV.1.2 – Grupo 2 (animais machos e fêmeas com 24 e 12 meses de idade respectivamente submetidos ou não ao protocolo de etanol)

As figuras IV.7 a IV.10 fornecem as visualizações 3D das áreas que foram quantificadas, de todos os grupos estudados (grupo controle -2a e grupo submetido ao protocolo de etanol -2b)).

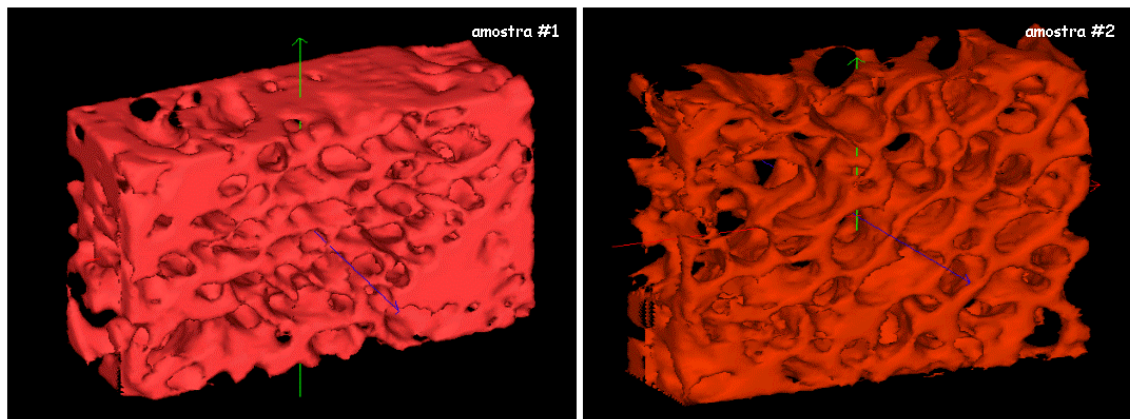


FIGURA IV.7 – VISUALIZAÇÕES 3D – FÊMEAS_CONTROLE COM 12 MESES DE IDADE.

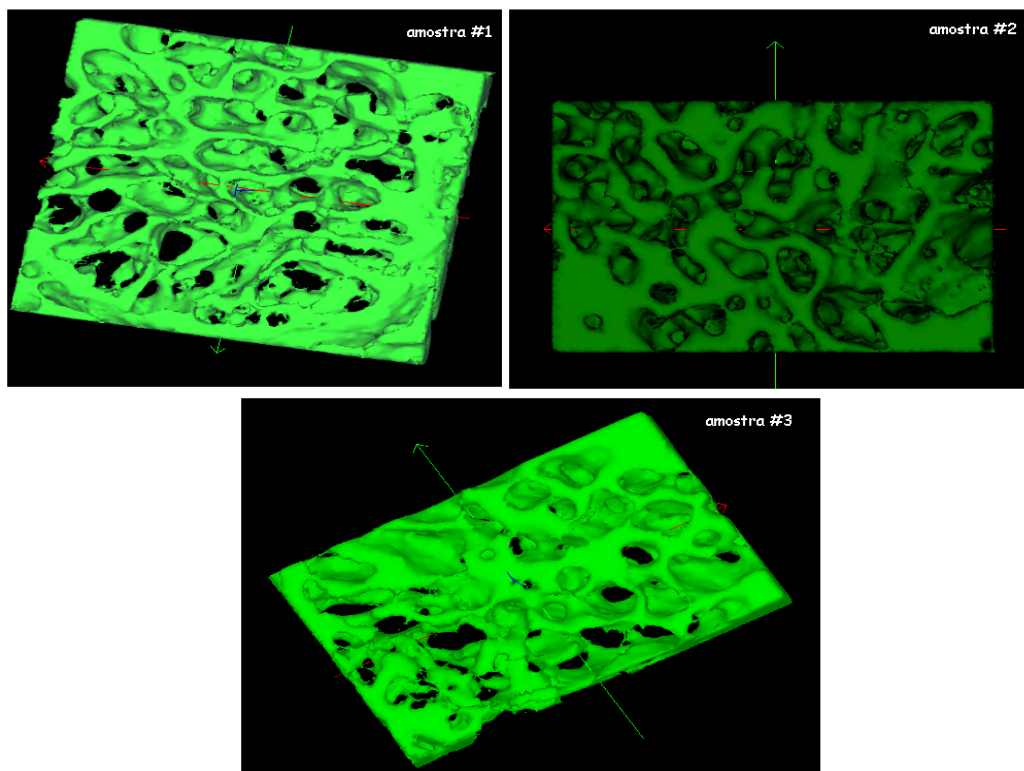


FIGURA IV.8 – VISUALIZAÇÕES 3D – FÊMEAS_ ETANOL COM 12 MESES DE IDADE.

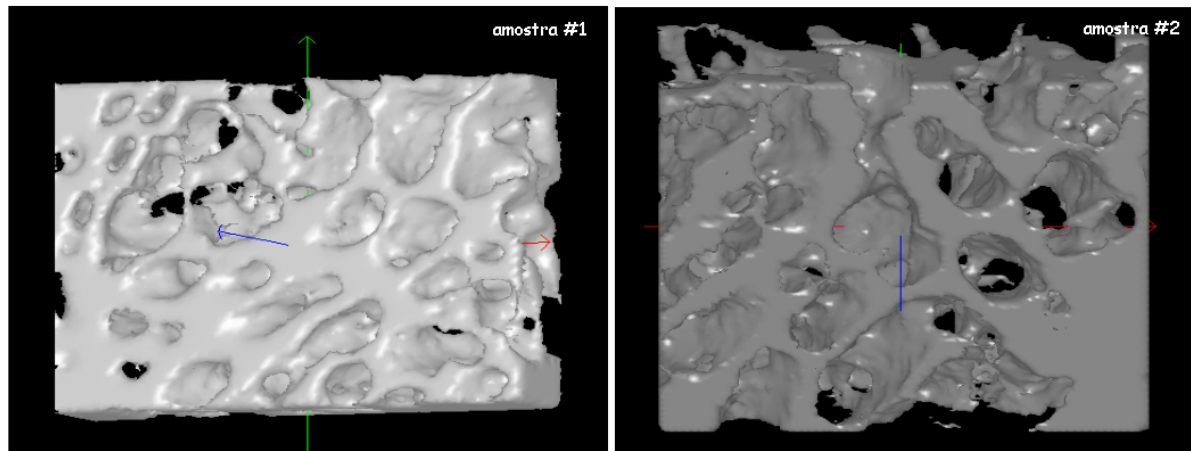


FIGURA IV.9 – VISUALIZAÇÕES 3D – MACHOS_CONTROLE COM 24 MESES DE IDADE.

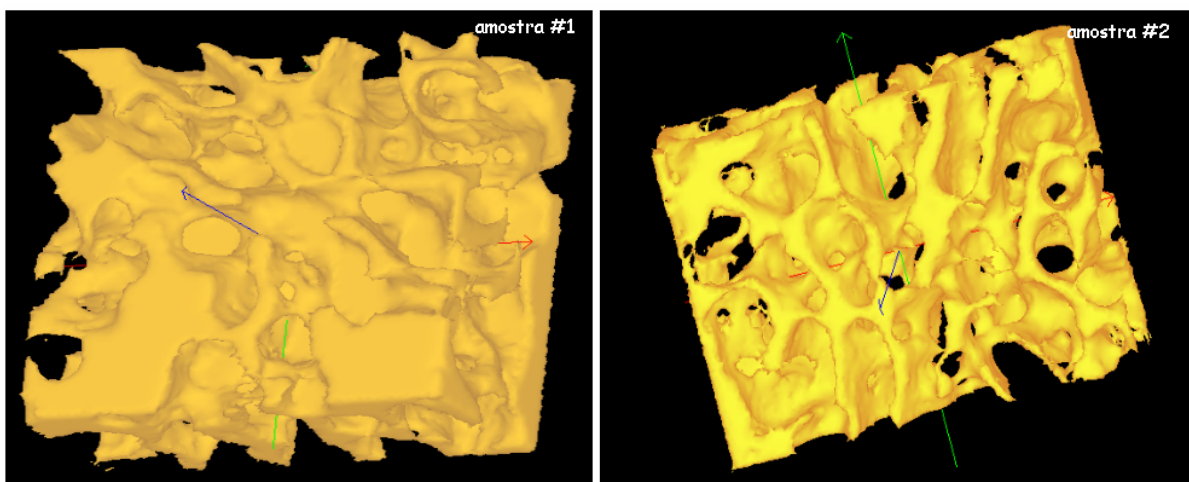


FIGURA IV.10 – VISUALIZAÇÕES 3D – MACHOS_ETANOL COM 24 MESES DE IDADE.

A figura IV.11 ilustra o “box-plot” das áreas avaliadas. Esse tipo de gráfico oferece uma representação gráfica dos dados através de seus resumos de cinco números. O ponto dentro da caixa representa a localização da mediana dos dados. Note ainda que a linha horizontal abaixo do ponto mediano

Micro CT

representa a localização de Q1 (primeiro quartil) e a linha horizontal acima da mediana representa a localização de Q3 (terceiro quartil).

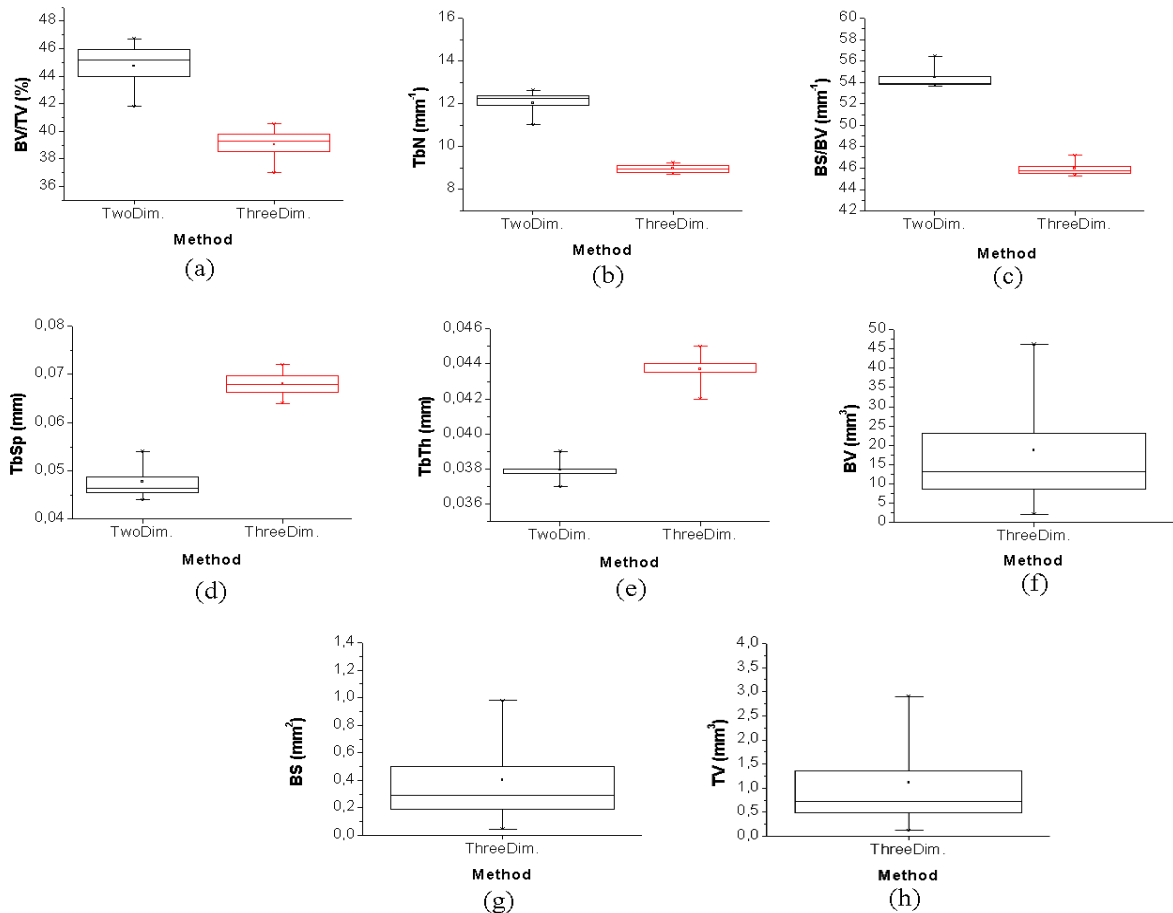


FIGURA IV.11 –“BOX-PLOT” DAS ÁREAS AVALIADAS: (A) A (E) SÃO OS RESULTADOS DE TODOS OS PARÂMETROS NOS DOIS MÉTODOS (2D E 3D), (F) A (G) SÃO OS PRINCIPAIS PARÂMETROS DO MÉTODO 3D.

A figura IV.12 apresenta o processo de binarização e seus histogramas com vários valores de “threshold” (TH) com o intuito de ilustrar a influência desse parâmetro nas imagens. Já a figura IV.13 demonstra a influência do TH no parâmetro ósseo principal (BV/TV) e sua correlação. Nesse caso, foi encontrada uma forte correlação entre os parâmetros avaliados ($r = -0,998$).

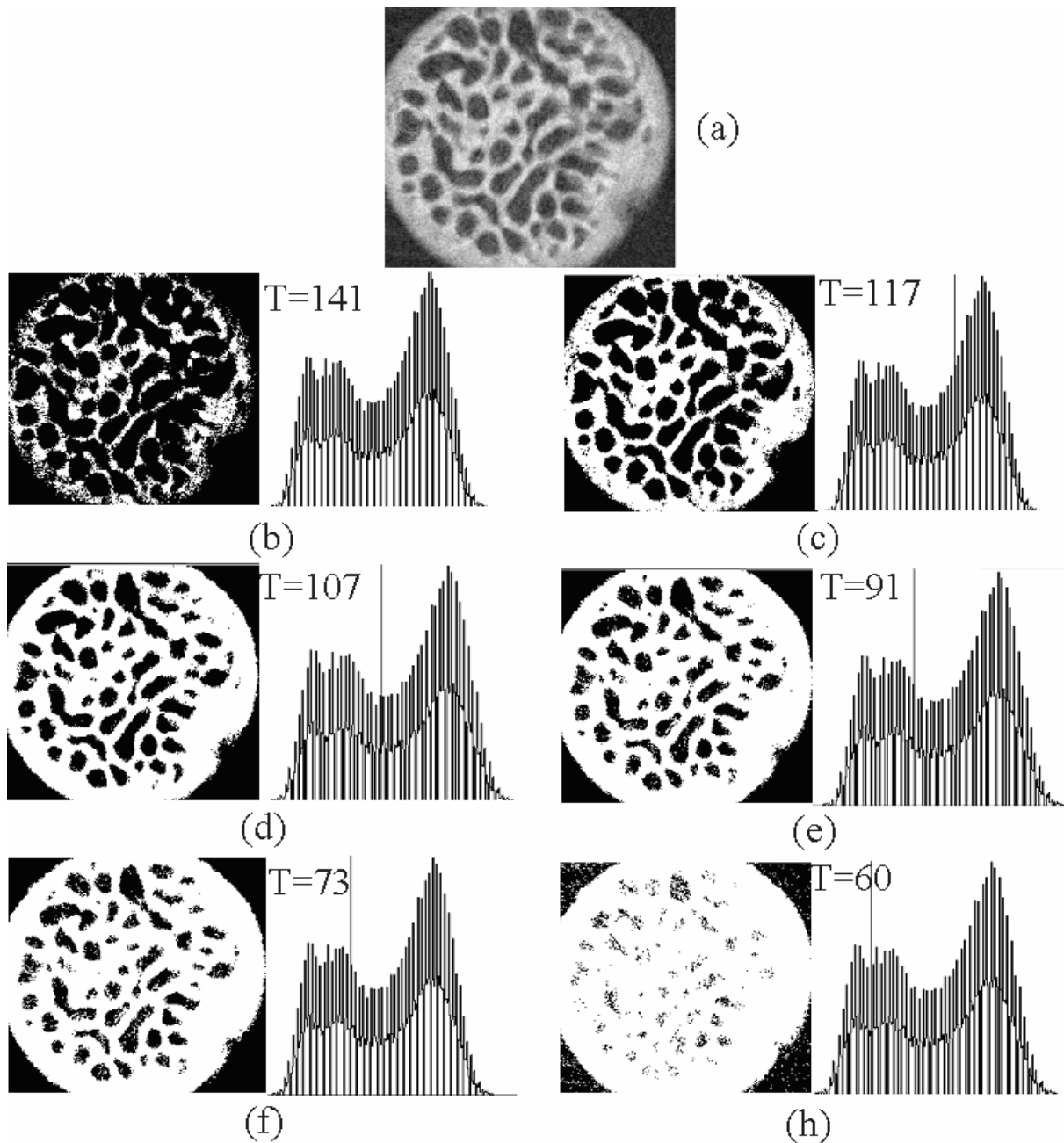


FIGURA IV.12 – HISTOGRAMA DAS IMAGENS (CABEÇA FEMORAL) – A ESCOLHA DO VALOR DE “THRESHOLD” (T): (A) IMAGEM ORIGINAL, (B) T=141, (C) T=117, (D) T=107, (E) T=91, (F) T=73, (G) T=60.

As tabelas IV.5 e IV.6 mostram os resultados das quantificações para todos os grupos avaliados, tanto bidimensionalmente quanto tridimensionalmente, respectivamente.

TABELA IV.5 – RESULTADOS 2D DO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA PARA OS ANIMAIS CONTROLE E SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ETANOL

Parâmetros	Grupo de Controle		Grupo Etanol	
	Fêmeas (12 meses)	Machos (24 meses)	Fêmeas (12 meses)	Machos (24 meses)
BV/TV (%)	48,2 ± 1,0	47,8 ± 7,5	46,4 ± 4,5	37,2 ± 1,5
BS/BV(mm ⁻¹)	50,0 ± 0,4	43,5 ± 7,6	58,2 ± 4,1	48,8 ± 1,0
TbTh (mm)	0,040 ± 0,001	0,048 ± 0,008 ^a	0,035 ± 0,003	0,042 ± 0,001 ^a
TbN (mm ⁻¹)	12,3 ± 0,2	10,2 ± 0,1 ^{a,b}	13,5 ± 0,4	8,9 ± 0,1 ^{a,b}
TbSp(mm)	0,043 ± 0,0001	0,053 ± 0,006 ^a	0,041 ± 0,005	0,073 ± 0,003 ^{a,b}

Todos os valores estão representados como média ± desvio padrão.

^a Estatisticamente significativo em relação ao sexo para um mesmo grupo, $\alpha=0.05$.

^b Estatisticamente significativo em relação ao protocolo (submetido ou não ao etanol), $\alpha=0.05$.

TABELA IV.6 – RESULTADOS 3D DO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA PARA OS ANIMAIS CONTROLE E SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE ETANOL

Parâmetros	Grupo de Controle		Grupo Etanol	
	Fêmeas (12 meses)	Machos (24 meses)	Fêmeas (12 meses)	Machos (24 meses)
BV/TV (%)	42,0 ± 0,9	42,0 ± 7,9	38,7 ± 4,7	31,7 ± 1,7
BS/BV(mm ⁻¹)	44,7 ± 2,1	37,7 ± 9,3	58,3 ± 5,9	44,5 ± 2,7
TbTh(mm)	0,045 ± 0,002	0,055 ± 0,01 ^a	0,034 ± 0,003 ^b	0,045 ± 0,003 ^{a,b}
TbN(mm ⁻¹)	9,4 ± 0,3	7,7 ± 0,5 ^a	11,2 ± 0,4 ^b	7,04 ± 0,06 ^{a,b}
TbSp(mm)	0,063 ± 0,001	0,075 ± 0,006 ^a	0,055 ± 0,006 ^b	0,097 ± 0,001 ^a
BV(mm ³)	1,02 ± 0,03	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,62 ± 0,06 ^b
BS(mm ²)	45,0 ± 0,9	23,9 ± 2,5	30,9 ± 8,9	27,5 ± 1,2
TV(mm ³)	2,41 ± 0,08	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,3 ^b	1,44 ± 0,07 ^b

^a Estatisticamente significativo em relação ao sexo para um mesmo grupo, $\alpha=0.05$.

^b Estatisticamente significativo em relação ao protocolo (submetido ou não ao etanol), $\alpha=0.05$.

Os resultados da tabela IV.5 revelam que:

- i. Tanto para o grupo de controle quanto para o grupo etanol, apenas foram significativos entre os sexos os parâmetros TbTh (distância trabecular), TbN (densidade trabecular) e TbSp (espessura trabecular);
- ii. Comparando os grupos controle e etanol, os parâmetros tomográficos que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram TbN e TbSp apenas para os machos.

Os resultados da tabela IV.6 revelam que:

- i. Tanto para o grupo de controle quanto para o grupo etanol, apenas foram significativos entre os sexos os parâmetros TbTh, TbN e TbSp.
- ii. Comparando os grupos controle e etanol, os parâmetros tomográficos que apresentaram diferença estatisticamente significativa foram: para o sexo masculino TbTh, TbN, TbSp e TV (volume total); para o sexo feminino TbTh, TbN, TbSp e TV.

Também foram comparados as avaliações feitas tanto no método 2D quanto no método 3D, para todos os parâmetros tomográficos levantados e foram encontrados os seguintes resultados:

- i. Para o grupo controle, os parâmetros que apresentaram uma diferença estatisticamente significativa foram TbN para ambos os sexos e BV/TV para o sexo feminino;
- ii. Para o grupo etanol, os parâmetros que apresentaram uma diferença estatisticamente significativa foram TbN para ambos os sexos e BV/TV e TbSp para o sexo masculino.

De acordo com os resultados apresentados nas tabelas IV.5 e IV.6 nota-se que o sexo masculino apresentou um dano maior em sua estrutura óssea

devido a ingestão de etanol, uma vez que seus parâmetros sofreram uma maior influência.

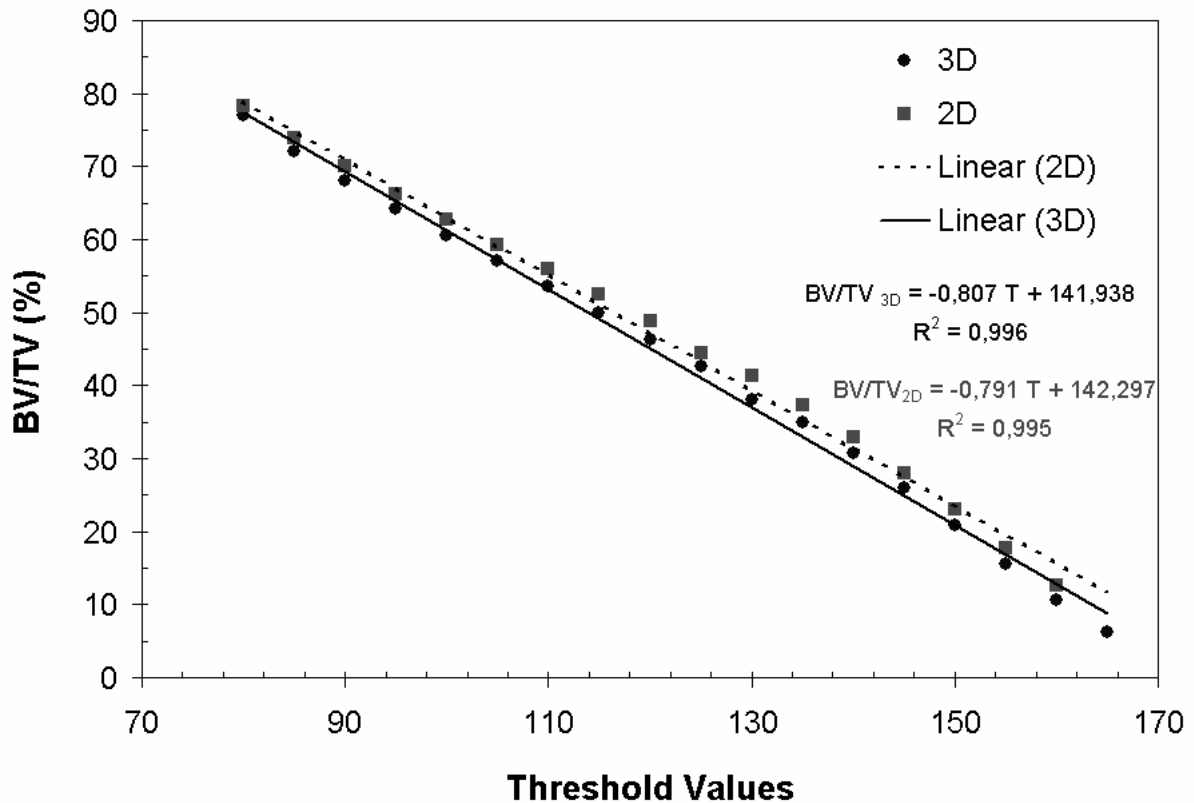


FIGURA IV.13 – CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE “THRESHOLD” (TH) E BV/TV.

IV.1.4 – Grupo 3 (biópsias humanas)

As tabelas IV.7 e IV.8 apresentam os resultados das quantificações ósseas e as figuras IV.14 e IV.15 ilustram as reconstruções 2D e 3D das biópsias analisadas, respectivamente, e a figura IV.16 apresenta o comportamento do parâmetro BV/TV ao longo das amostras. Nessa figura, tem-se que as linhas de cor rosa representam o valor médio obtido através do método 2D e as linhas verdes o valor através do método 3D.

TABELA IV.7 – RESULTADOS 2D DO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA DAS BIÓPSIAS HUMANAS.

Parâmetros	Amostras					
	1	2	3	4	5	6
BV/TV (%)	10,7 ± 2,7	31,1 ± 2,3	28,7 ± 2,0	26,7 ± 1,8	25,2 ± 2,9	21,1 ± 1,7
BS/BV(mm⁻¹)	62,9 ± 7,2	27,7 ± 3,2	31,2 ± 2,2	34,2 ± 4,5	30,5 ± 3,1	31,3 ± 3,2
TbTh(mm)	0,03 ± 0,004	0,07 ± 0,005	0,07 ± 0,005	0,06 ± 0,005	0,07 ± 0,005	0,06 ± 0,004
TbN(mm⁻¹)	3,3 ± 0,8	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,3	4,6 ± 0,6	3,8 ± 0,4	3,3 ± 0,3
TbSp(mm)	0,3 ± 0,06	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02

Todos os valores estão representados como média ± desvio padrão da média.

TABELA IV.8 – RESULTADOS 3D DO PROCESSO DE QUANTIFICAÇÃO TOMOGRÁFICA DAS BIÓPSIAS HUMANAS.

Parâmetros	Amostras					
	1	2	3	4	5	6
BV/TV (%)	8,3	27,0	25,0	23,2	21,5	17,6
BS/BV(mm⁻¹)	75,7	24,2	27,6	31,3	28,2	30,8
TbTh(mm)	0,03	0,08	0,07	0,06	0,07	0,07
TbN(mm⁻¹)	3,1	3,3	3,4	3,6	3,0	2,7
TbSp(mm)	0,3	0,2	0,2	0,2	2,6	0,3
BV(mm³)	1,5	6,1	6,0	4,9	15,4	6,9
BS(mm²)	110,8	146,2	166,4	153,9	435,9	211,8
TV(mm³)	0,18	0,22	0,24	0,21	0,72	0,39

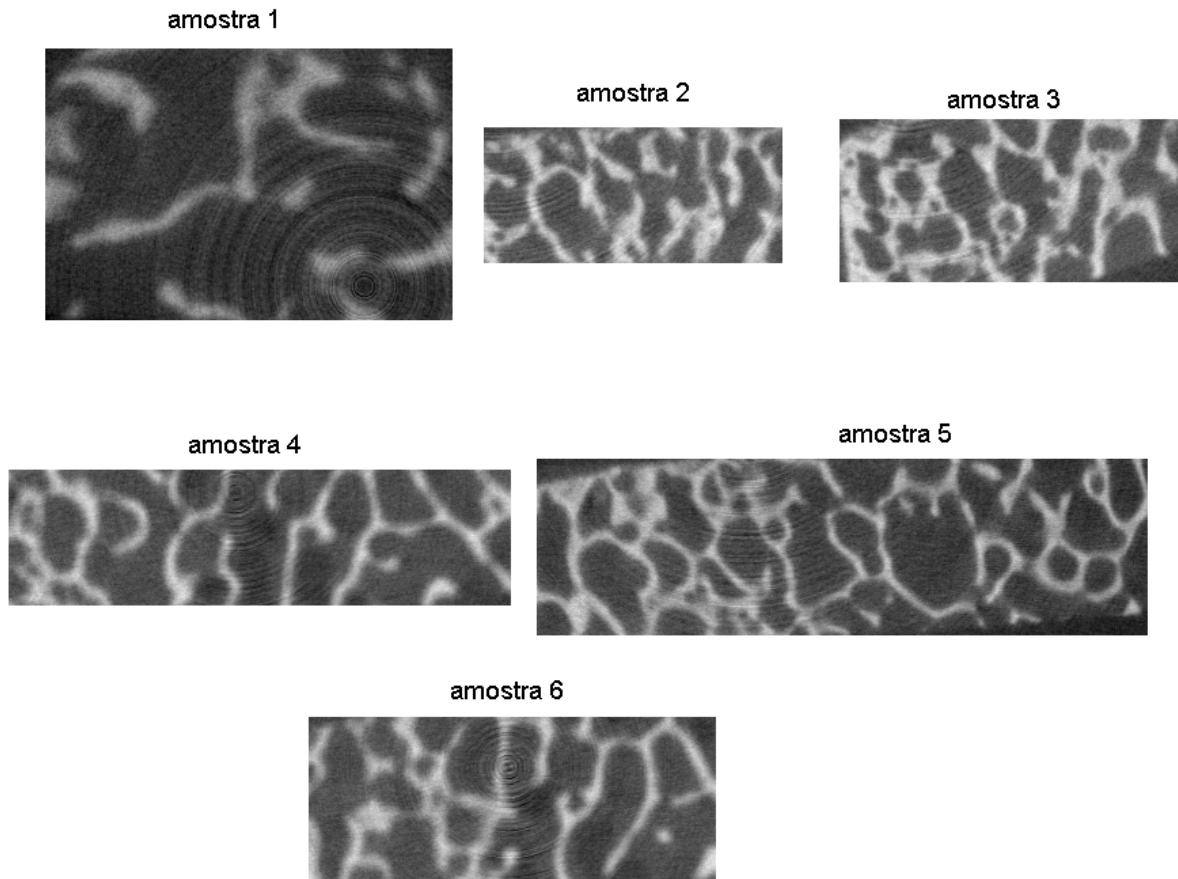


FIGURA IV.14 – VISUALIZAÇÕES 2D DE TODAS AS BIÓPSIAS ANALISADAS: PARA CADA AMOSTRA FOI ESCOLHIDO ALEATORIAMENTE UM “SLICE” DA RECONSTRUÇÃO.

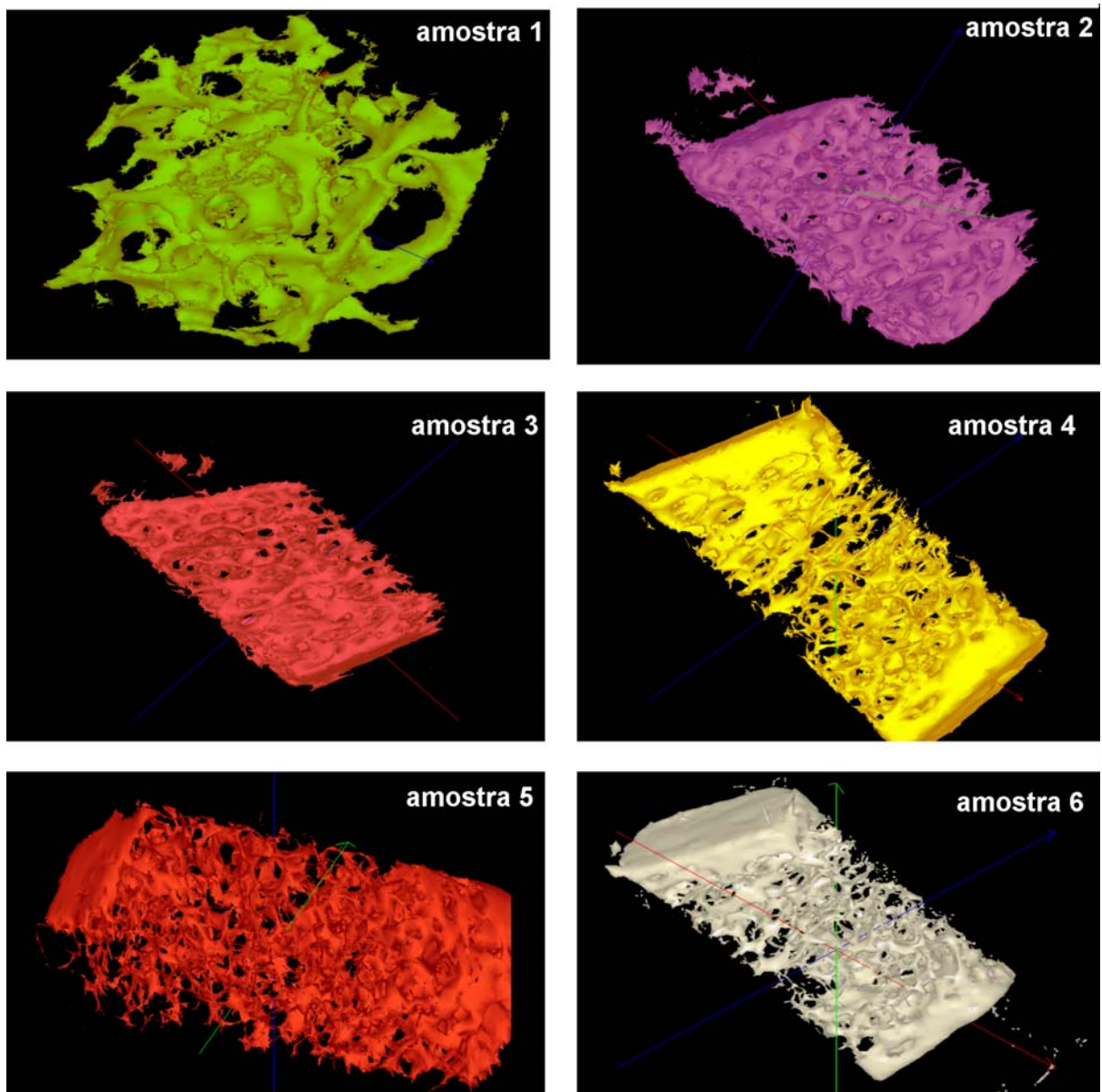


FIGURA IV.15 – VISUALIZAÇÕES 3D DE TODAS AS BIÓPSIAS HUMANAS.

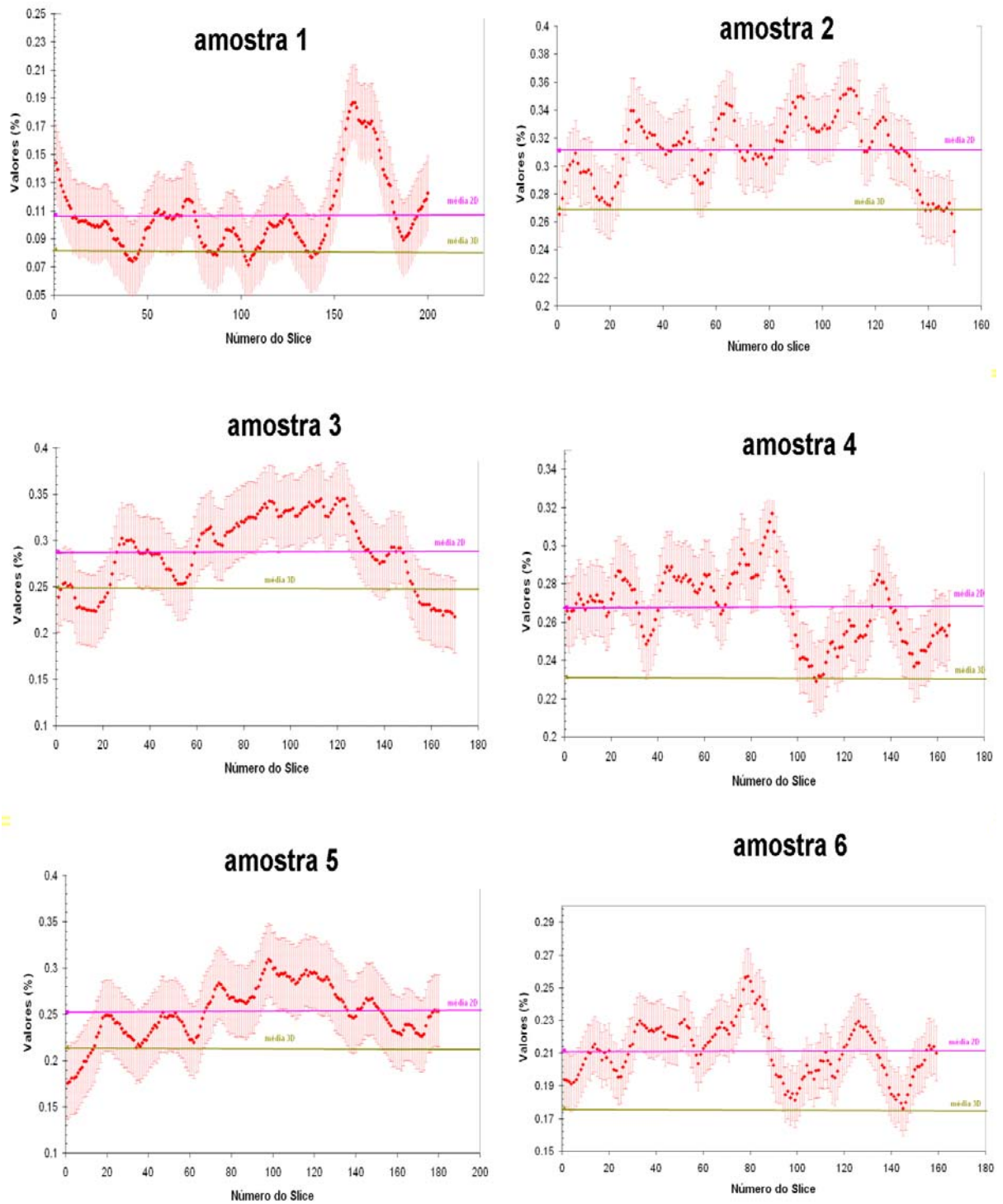


FIGURA IV.16 – COMPORTAMENTO DE BV/TV AO LONGO DAS BIÓPSIAS HUMANAS.

IV. 2. Fluorescência de Raios X por Dispersão em Energia

A figura IV.17 apresenta um exemplo de espectro obtido com a técnica de EDXRF e a figura IV.18 um detalhe do mesmo.

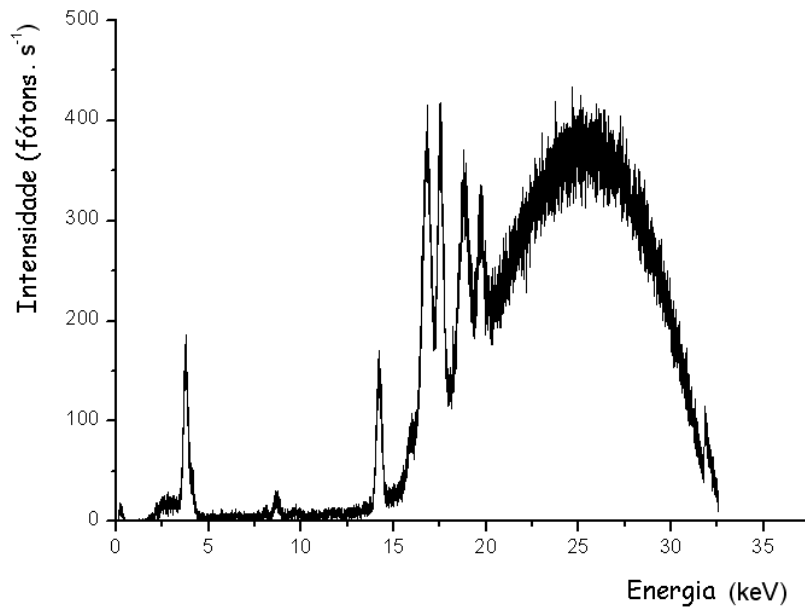


FIGURA IV.17 – EXEMPLO DE UM ESPECTRO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE EDXRF, PARA UMA AMOSTRA DE OSSO (CABEÇA FEMORAL).

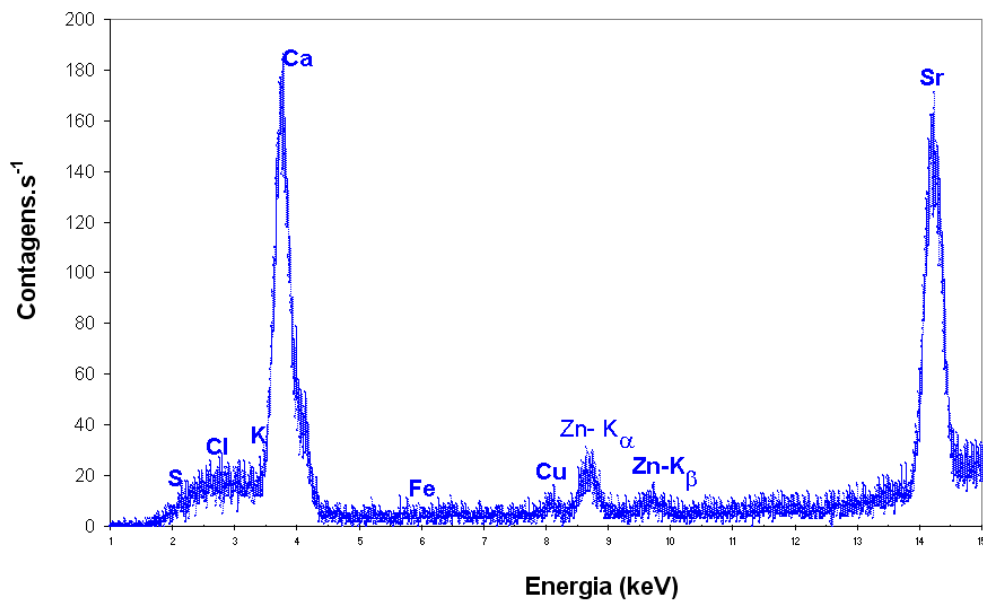


FIGURA IV.18 – DETALHE DO ESPECTRO ANTERIOR.

A seguir, nas figuras IV.19, 10 e 21, serão ilustrados os gráficos de sensibilidade, absorção e limite de detecção, respectivamente.

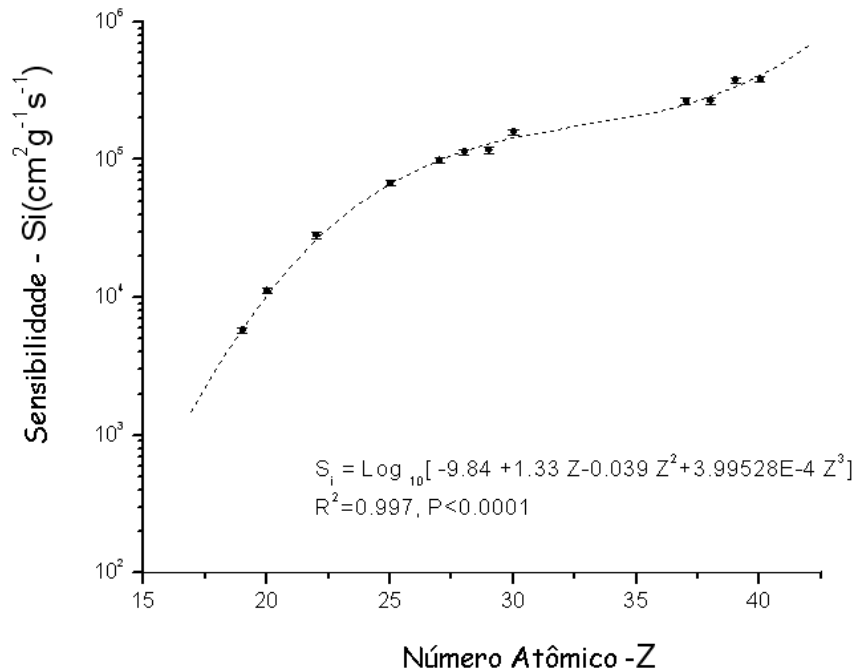


FIGURA IV.19 – CURVA DE SENSIBILIDADE – EDXRF.

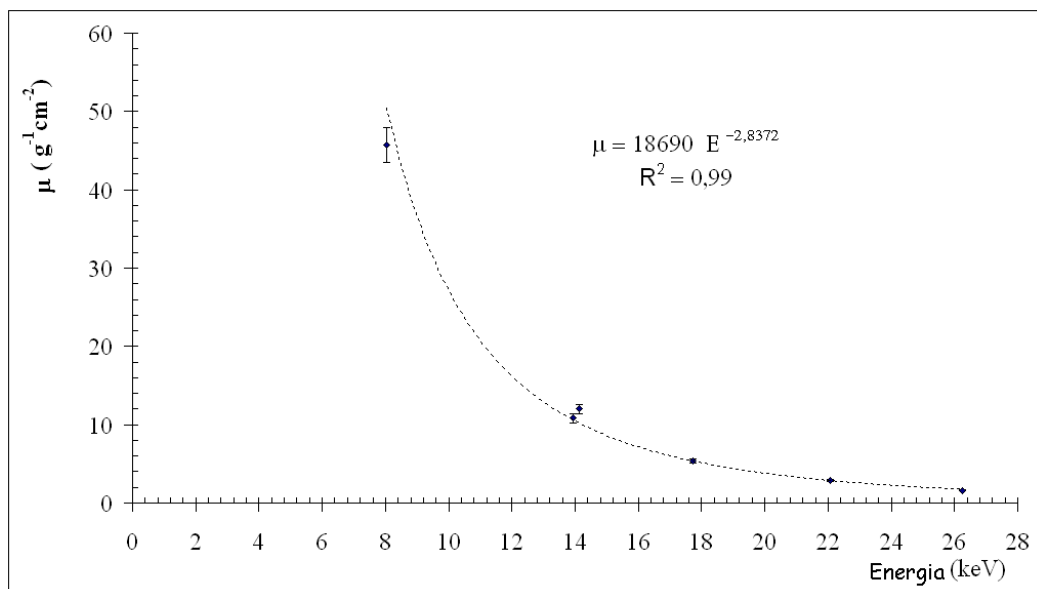


FIGURA IV.20 – CURVA DE ABSORÇÃO – EDXRF.

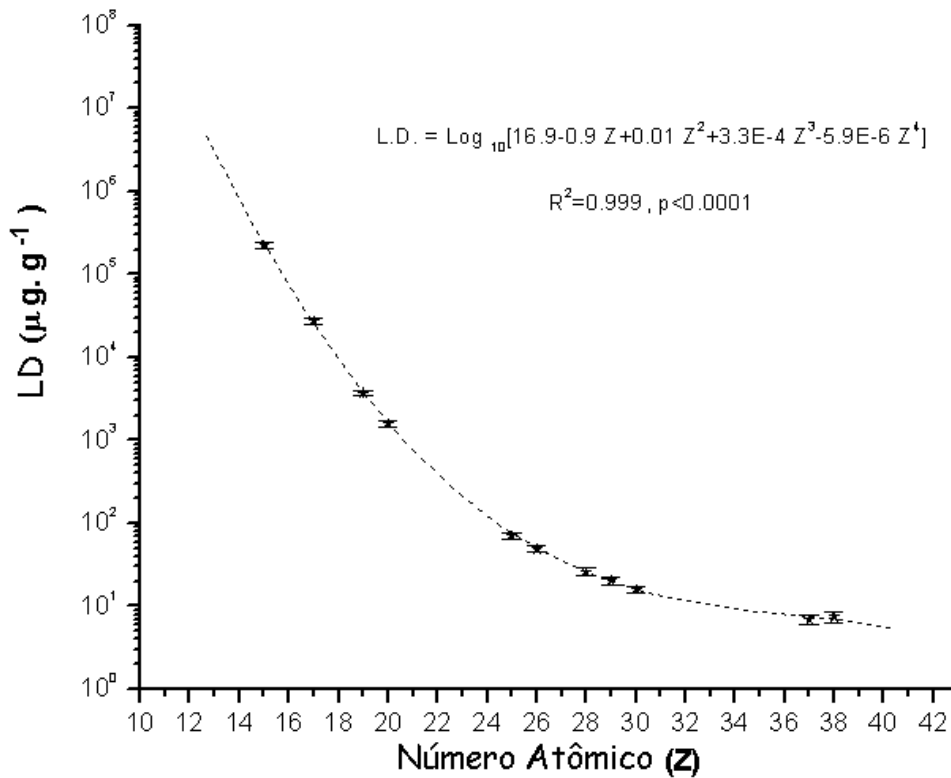


FIGURA IV.21 – CURVA DO LIMITE DE DETECÇÃO (LD) – EDXRF.

Através dos parâmetros apresentados nas figuras anteriores foi possível calcular as concentrações dos elementos presentes nas amostras ósseas analisadas.

IV.2.1 – Resultados para a região da cabeça femoral

As figuras IV.22 e IV.23 mostram os gráficos dos resultados das concentrações elementares para os grupos de controle (grupo 1 e parte do grupo 2) analisados (na região da cabeça femoral) e, a tabela IV. 9, ilustra o resumo desses resultados, juntamente com as informações sobre a análise estatística realizada.

Foi feito também um estudo sobre o grau de correlação entre os elementos encontrados, que se encontra na tabela IV.10. Nessa tabela, os dados destacados em vermelho ilustram as correlações fortes enquanto que as em verde enfatizam as correlações consideradas médias.

EDXRF

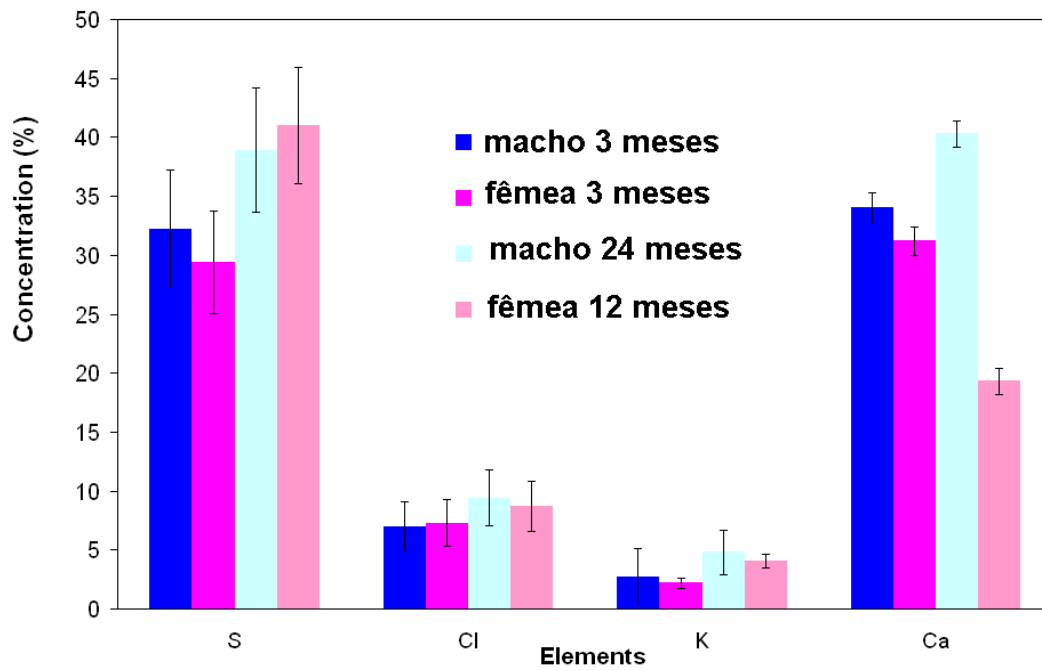


FIGURA IV.22 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS DE RATOS JOVENS E IDOSOS – EDXRF (ELEMENTOS MAJORITÁRIOS).

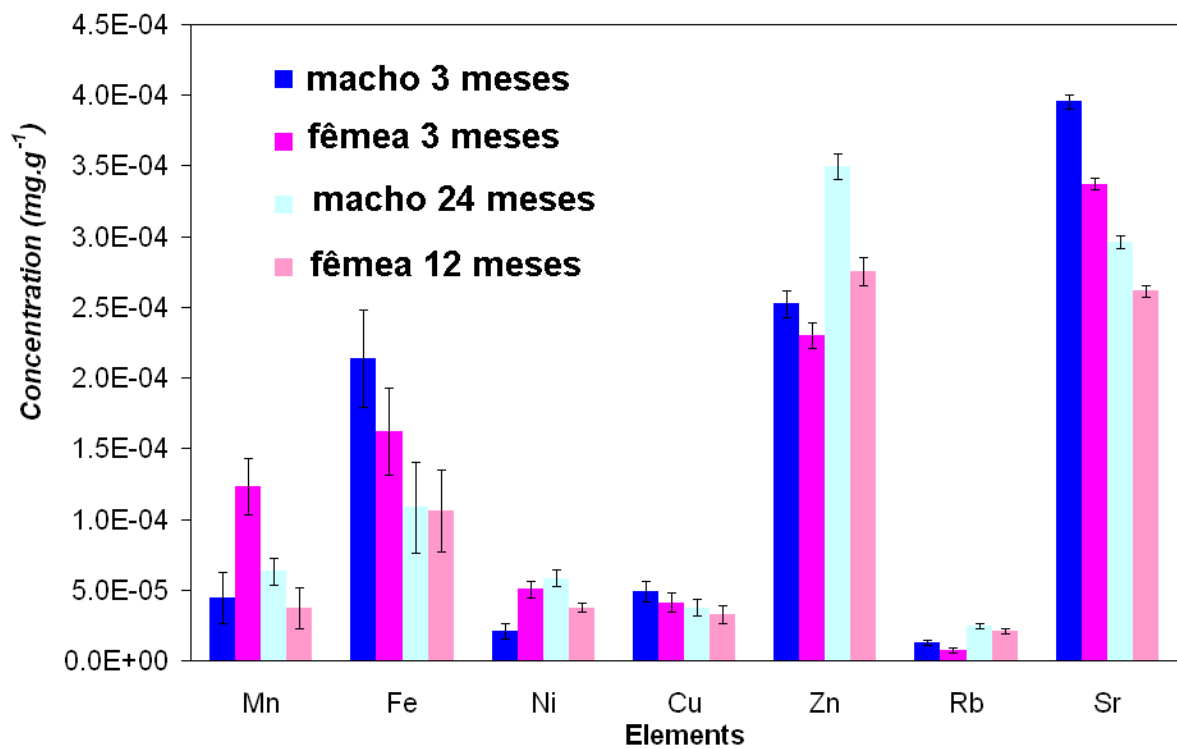


FIGURA IV.23 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS DE RATOS JOVENS E IDOSOS – EDXRF (ELEMENTOS TRAÇO).

TABELA IV.9 – RESULTADO DAS CONCENTRAÇÕES.

ELEMENTOS	AMOSTRAS			
	<i>Macho 3 meses</i>	<i>Fêmea 3 meses</i>	<i>Macho 24 meses</i>	<i>Fêmea 12 meses</i>
S [*]	38,9 ± 5,3	29,5 ± 4,3	32,2 ± 5,0	41,0 ± 4,9
Cl [*]	9,4 ± 2,4	7,3 ± 2,0	7,0 ± 2,1	8,7 ± 2,
K [*]	4,8 ± 1,9	2,2 ± 0,4	2,7 ± 1,6	4,1 ± 0,6
Ca [*]	40,3 ± 1,1	31,2 ± 1,2	34,7 ± 1,3	19,3 ± 1,1
Mn ^{**}	63,0 ± 19,1	123,2 ± 15,7	44,6 ± 18,0	36,9 ± 14,5
Fe ^{**}	108,2 ± 31,8	161,8 ± 30,7	213,6 ± 34,3	106,1 ± 29,2
Ni ^{**}	58,3 ± 5,6	50,4 ± 6,8	20,6 ± 6,4	37,5 ± 6,6
Cu ^{**}	37,5 ± 6,2	41,0 ± 6,6	48,8 ± 7,0	32,5 ± 6,4
Zn ^{**}	349,4 ± 9,2	230,3 ± 9,0	252,3 ± 9,3	275,2 ± 9,6
Rb ^{**}	24,3 ± 1,9	7,6 ± 1,8	12,5 ± 2,0	20,9 ± 2,0
Sr ^{**}	296,0 ± 4,7	337,2 ± 4,4	395,3 ± 4,8	261,5 ± 4,0

Todos os valores estão representados como média ± desvio padrão.

* Representam valores em %.

** representam valores em $\mu\text{g.g}^{-1}$.

TABELA IV.10 – RESULTADO DOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE PEARSON (R) PARA OS ELEMENTOS ENCONTRADOS PARA A AMOSTRA DE RATO MACHO_CONTROLE.

R	<i>S</i>	<i>Cl</i>	<i>Ar</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Mn</i>	<i>Fe</i>	<i>Ni</i>	<i>Cu</i>	<i>Zn</i>	<i>Rb</i>	<i>Sr</i>
S	1											
Cl	0,76	1										
Ar	0,08	0,42	1									
K	0,92	0,85	-0,07	1								
Ca	0,44	0,46	-0,59	0,72	1							
Mn	-0,69	-0,10	0,06	-0,40	0,08	1						
Fe	-0,79	-0,98	-0,53	-0,80	-0,30	0,22	1					
Ni	0,01	0,58	0,08	0,35	0,59	0,71	-0,44	1				
Cu	-0,75	-0,88	-0,70	-0,66	-0,02	0,34	0,96	-0,21	1			
Zn	0,71	0,75	-0,29	0,92	0,92	-0,09	-0,64	0,60	-0,40	1		
Rb	0,94	0,79	-0,13	0,99	0,72	-0,48	-0,75	0,26	-0,61	0,90	1	
Sr	-0,80	-0,91	-0,64	-0,72	-0,11	0,35	0,97	-0,24	1,00	-0,48	-0,68	1

A seguir serão apresentados os resultados dos animais submetidos ao protocolo de etanol: figura IV.24.

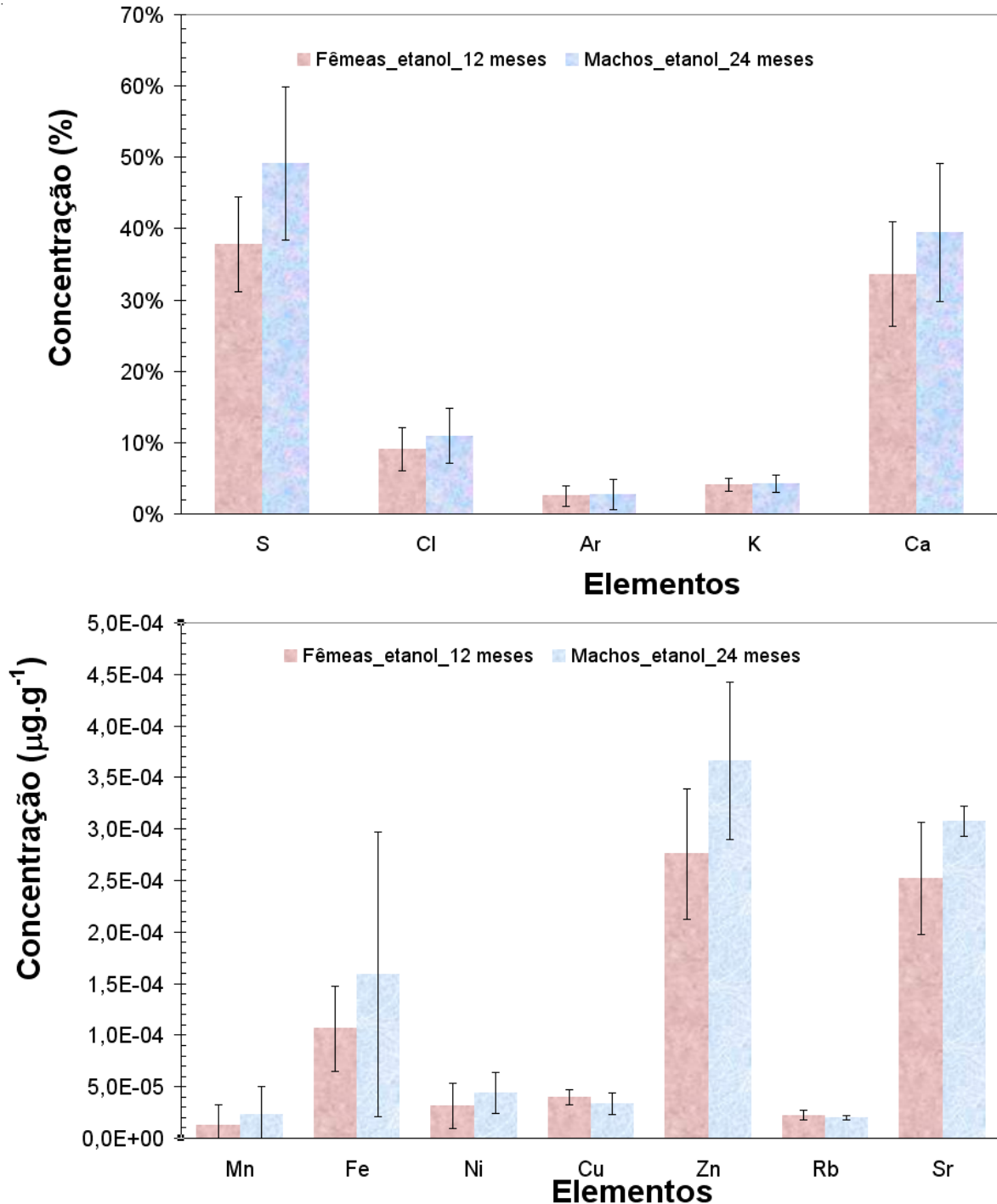


FIGURA IV.24 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS IDOSAS (ANIMAIS DE 12 E 24 MESES): CONTROLE E SUBMETIDAS AO PROTOCOLO DE ETANOL

A seguir serão exibidos os gráficos, nas figuras IV.25 e IV.26, das análises feitas na região dos côneilos, para as amostras controle (animais jovens com 3 meses e idosos com 12 e 24 meses, sem nenhuma patologia associada).

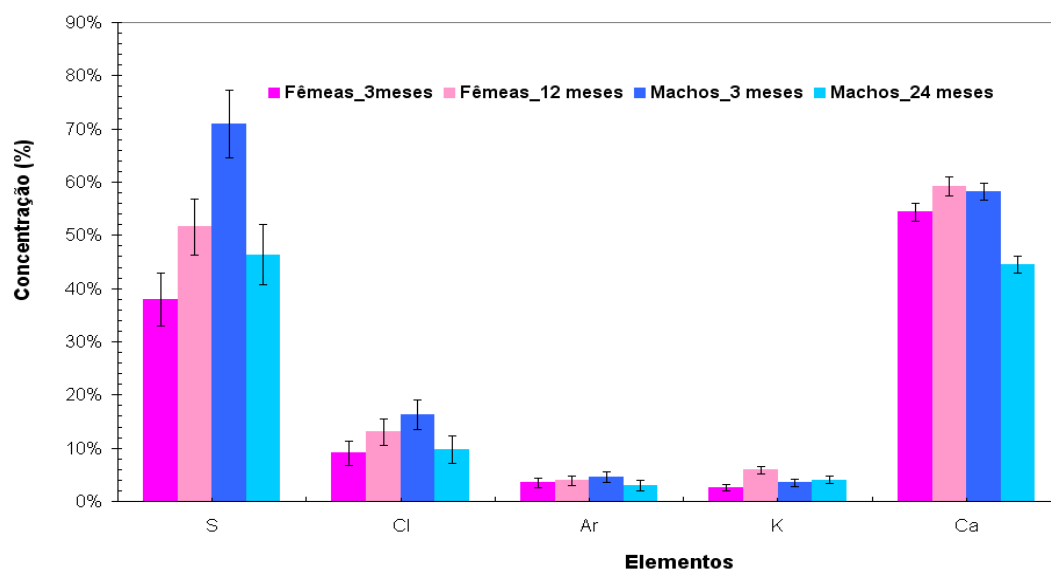


FIGURA IV.25 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS DE RATOS JOVENS E IDOSOS – CÔNDILOS -EDXRF (ELEMENTOS MAJORITÁRIOS).

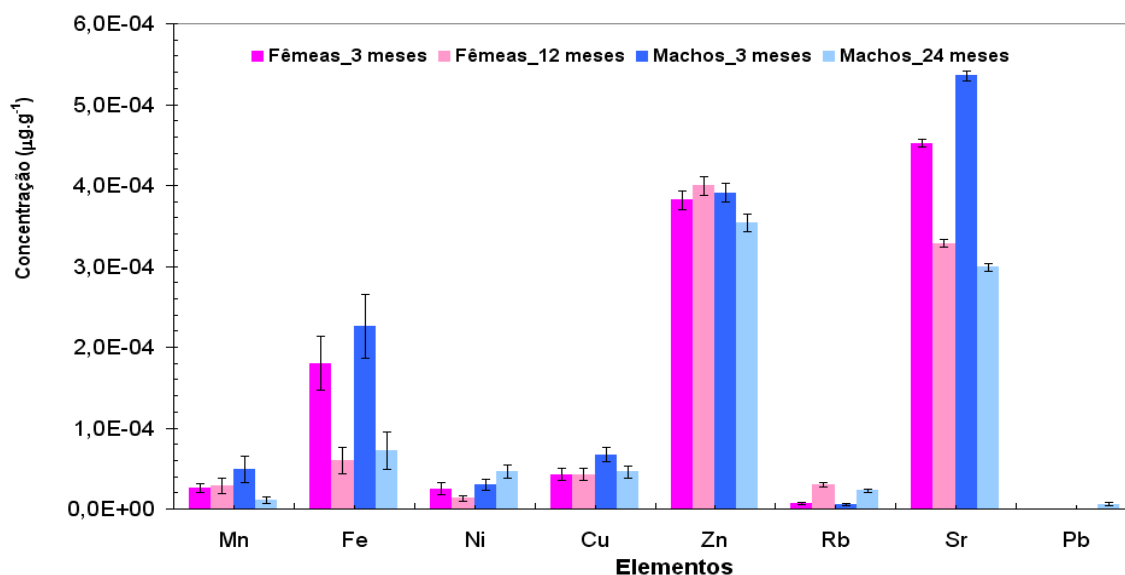
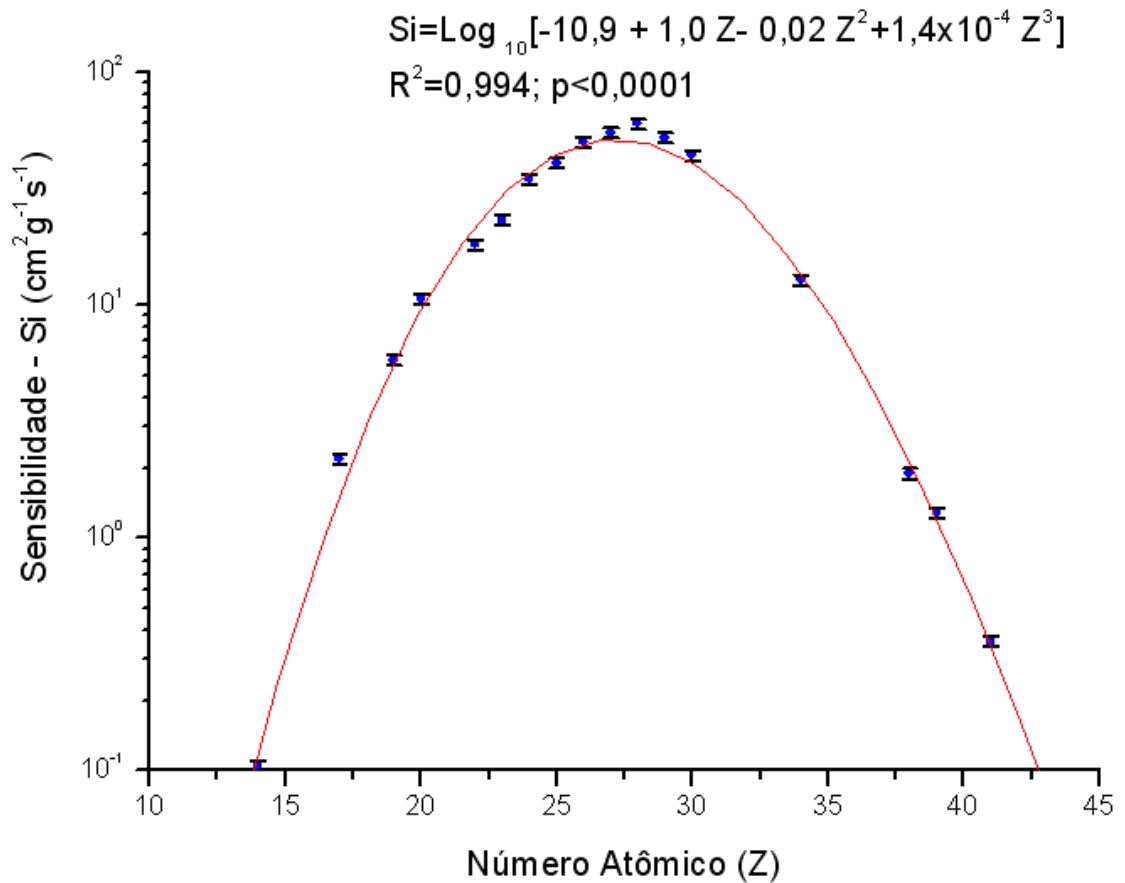
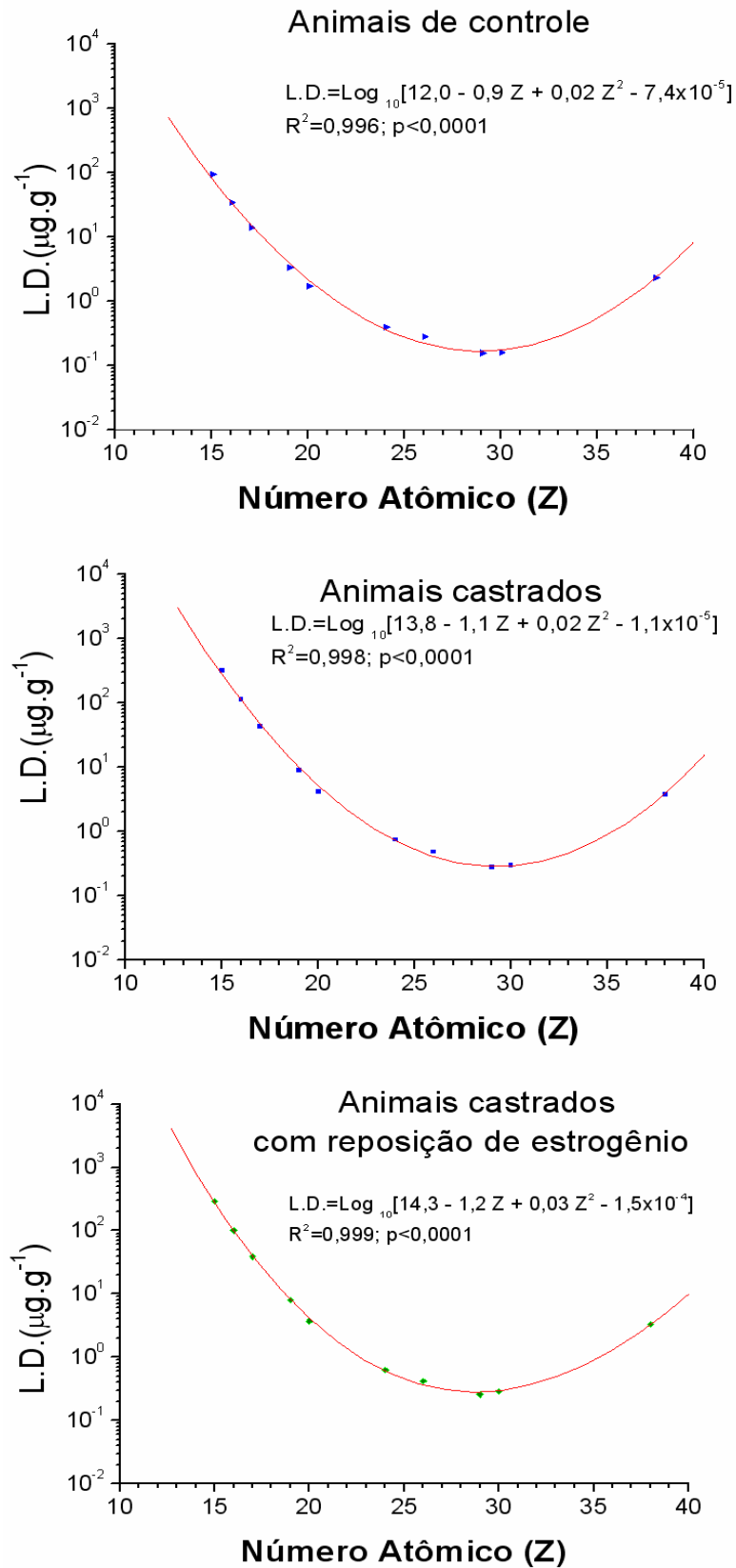


FIGURA IV.26 – CONCENTRAÇÕES PARA AS AMOSTRAS DE RATOS JOVENS E IDOSOS – CÔNDILOS -EDXRF (ELEMENTOS TRAÇO).

IV 3. Micro XRF-SR

A figura IV.27 apresenta a curva de sensibilidade do sistema de microfluorescência de raios X, obtida na linha XRF do LNLS. Enquanto que a figura V.28 ilustra as curvas de absorção, obtida através da técnica de μ XRF.

FIGURA IV.27 – CURVA DE SENSIBILIDADE – μ XRF.

FIGURA IV.28 – CURVA DE ABSORÇÃO – μ XRF.

Através da figura IV.29, pode-se entender quais as regiões representadas pelos perfis (exemplos ilustrados nas figuras IV.30, 31 e 32). As figuras IV.33 a IV.38 apresentam as imagens das distribuições superficiais de todos os elementos que foram encontrados, em escala de concentração para as amostras pertencentes ao grupo 4 (animais controle, castrados e castrados com reposição de estrogênio).

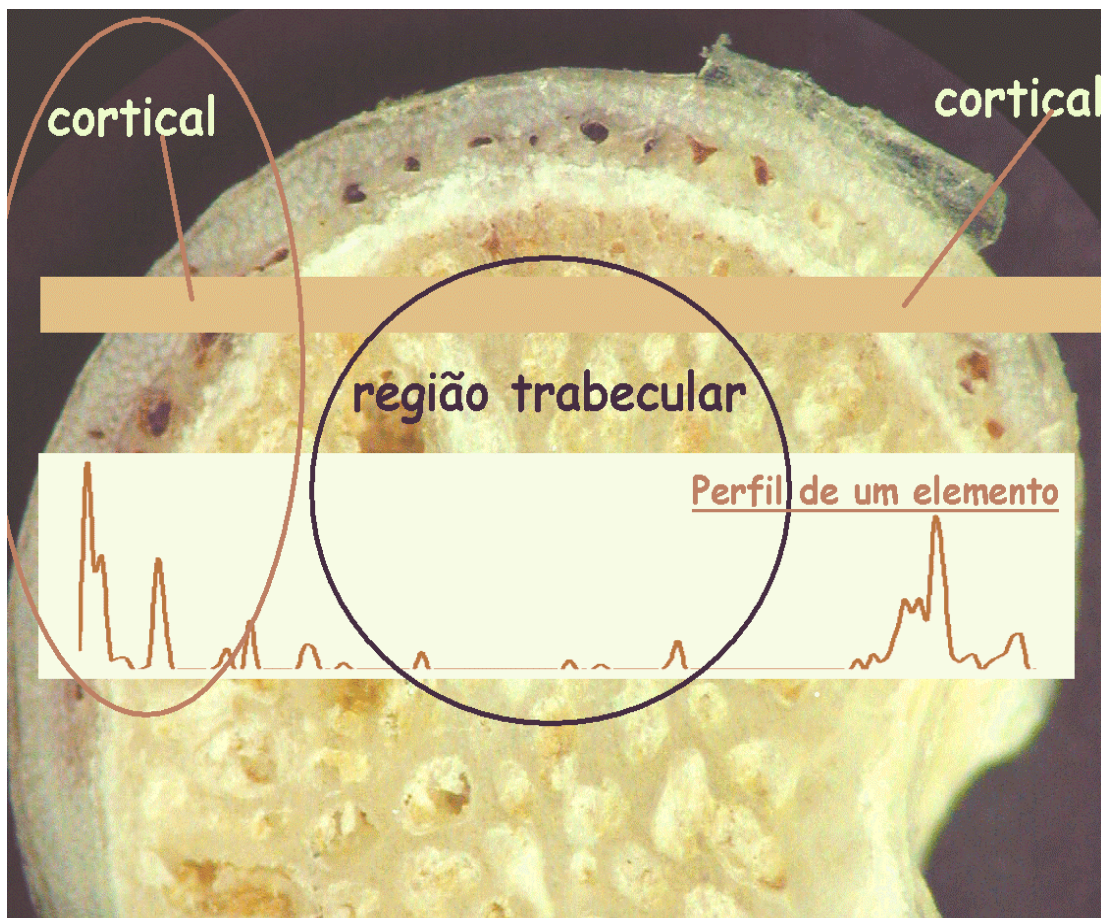


FIGURA IV.29– ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS MEDIDAS NAS AMOSTRAS ÓSSEAS PERTENCENTES AO GRUPO 4.

Perfis - Rata de Controle

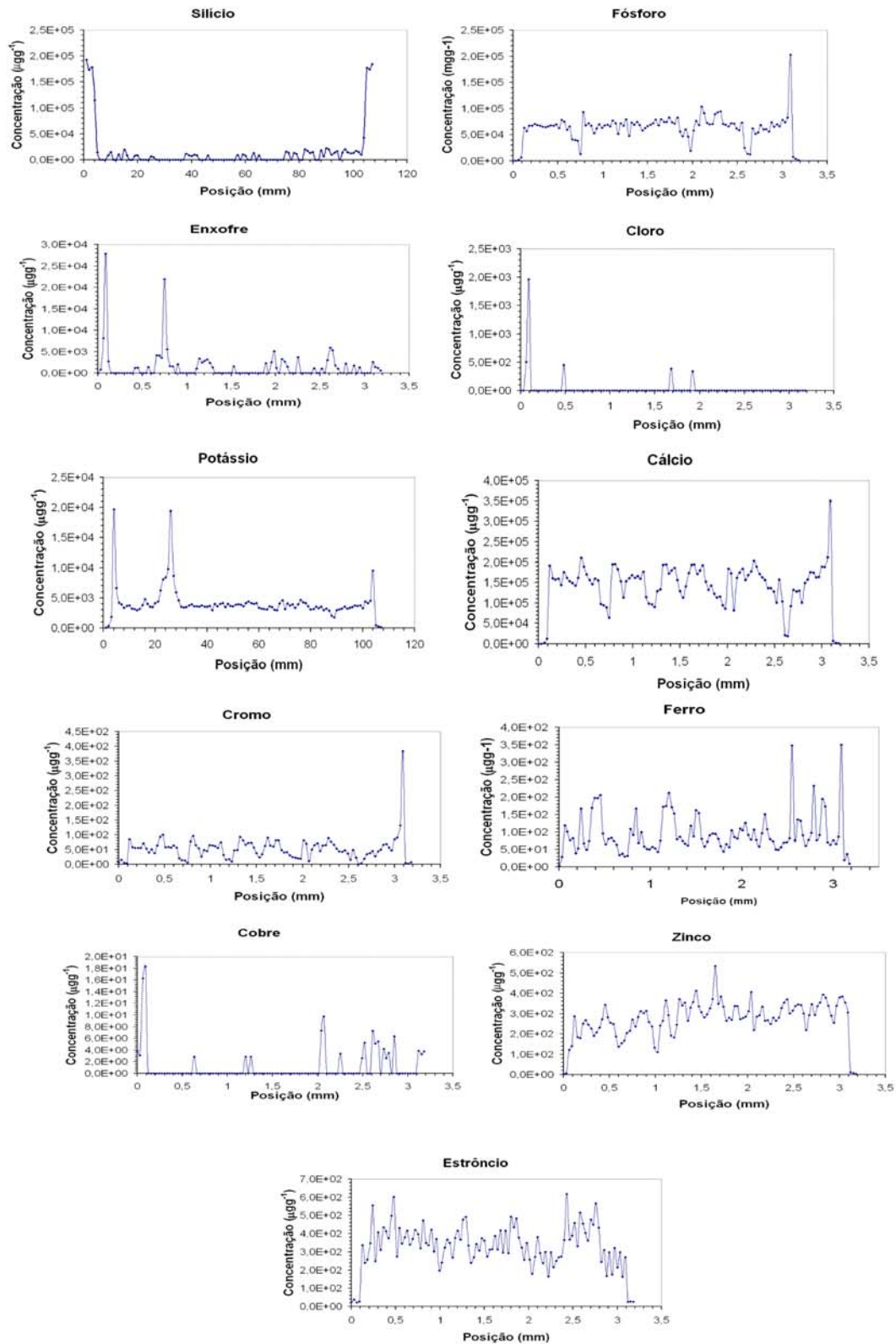


FIGURA IV.30 EXEMPLO DOS PERFIS ADQUIRIDOS PARA UMA AMOSTRA DE RATA CONTROLE.

Perfis de Ratas Castradas

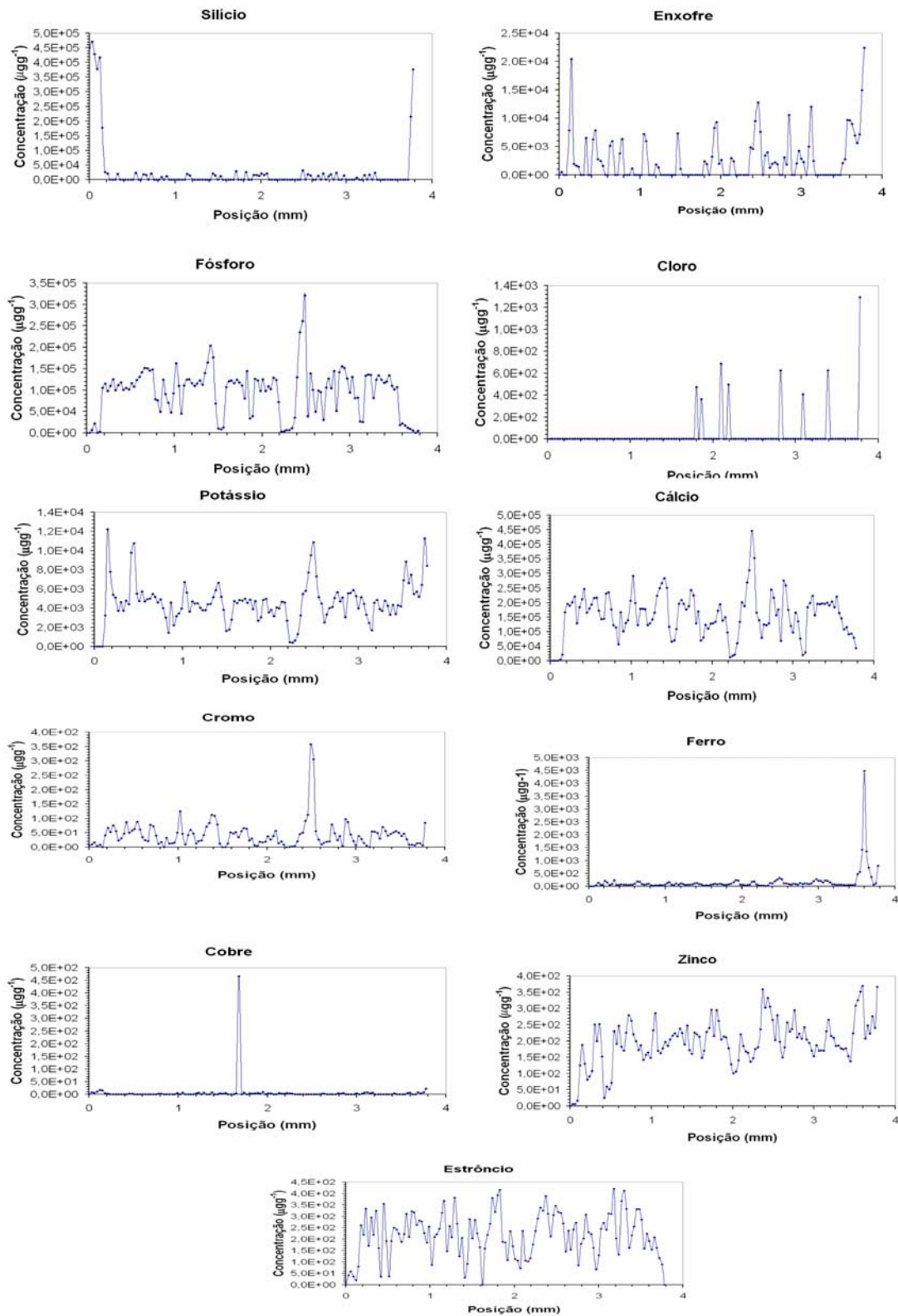


FIGURA IV.31 - EXEMPLO DOS PERFIS ADQUIRIDOS PARA UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA.

Perfis de Ratas Castradas com Reposição de Estrogênio

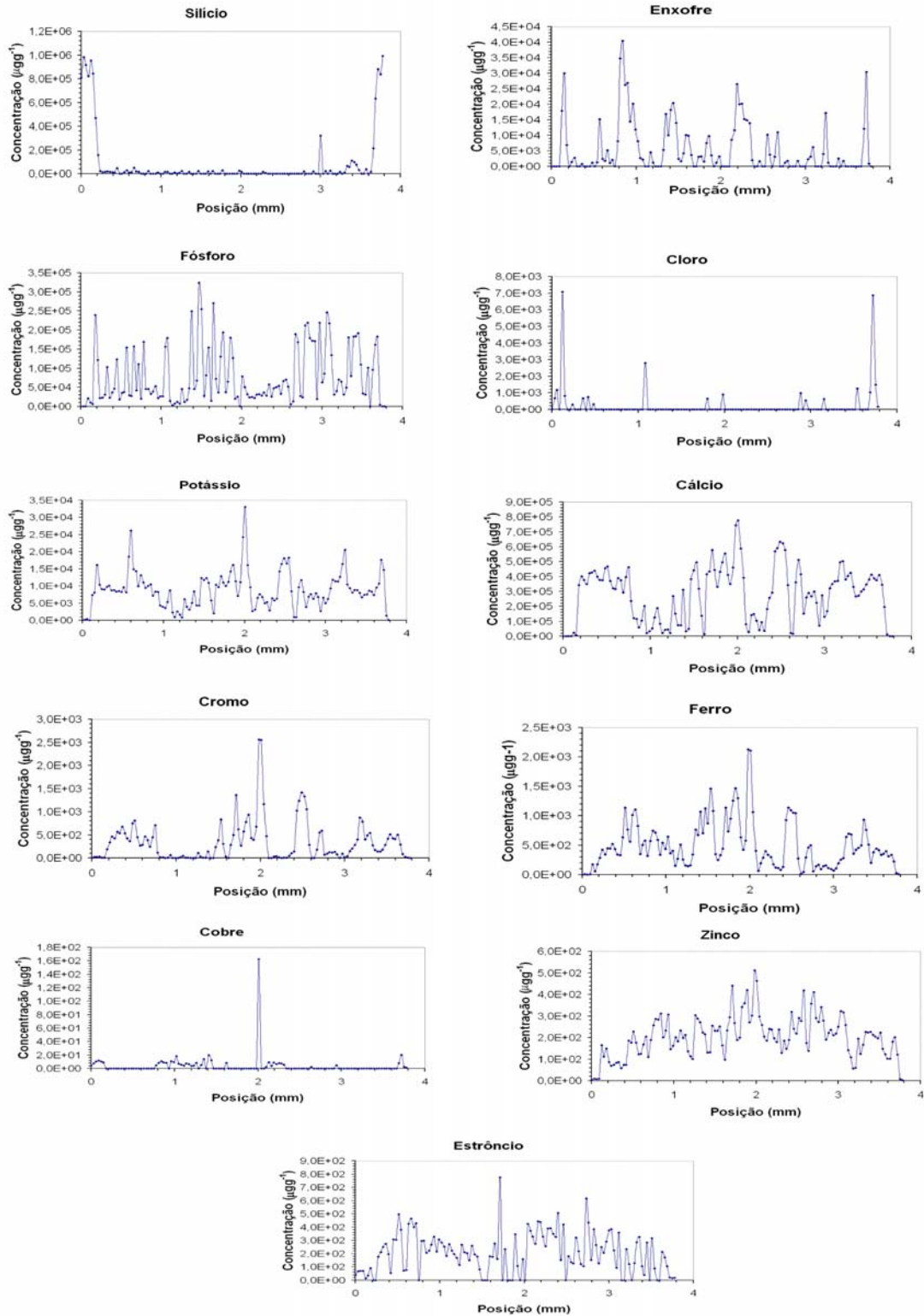


FIGURA IV.32 EXEMPLO DOS PERFIS ADQUIRIDOS PARA UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO.

Ratas Controle

(regiões: cortical e trabecular)

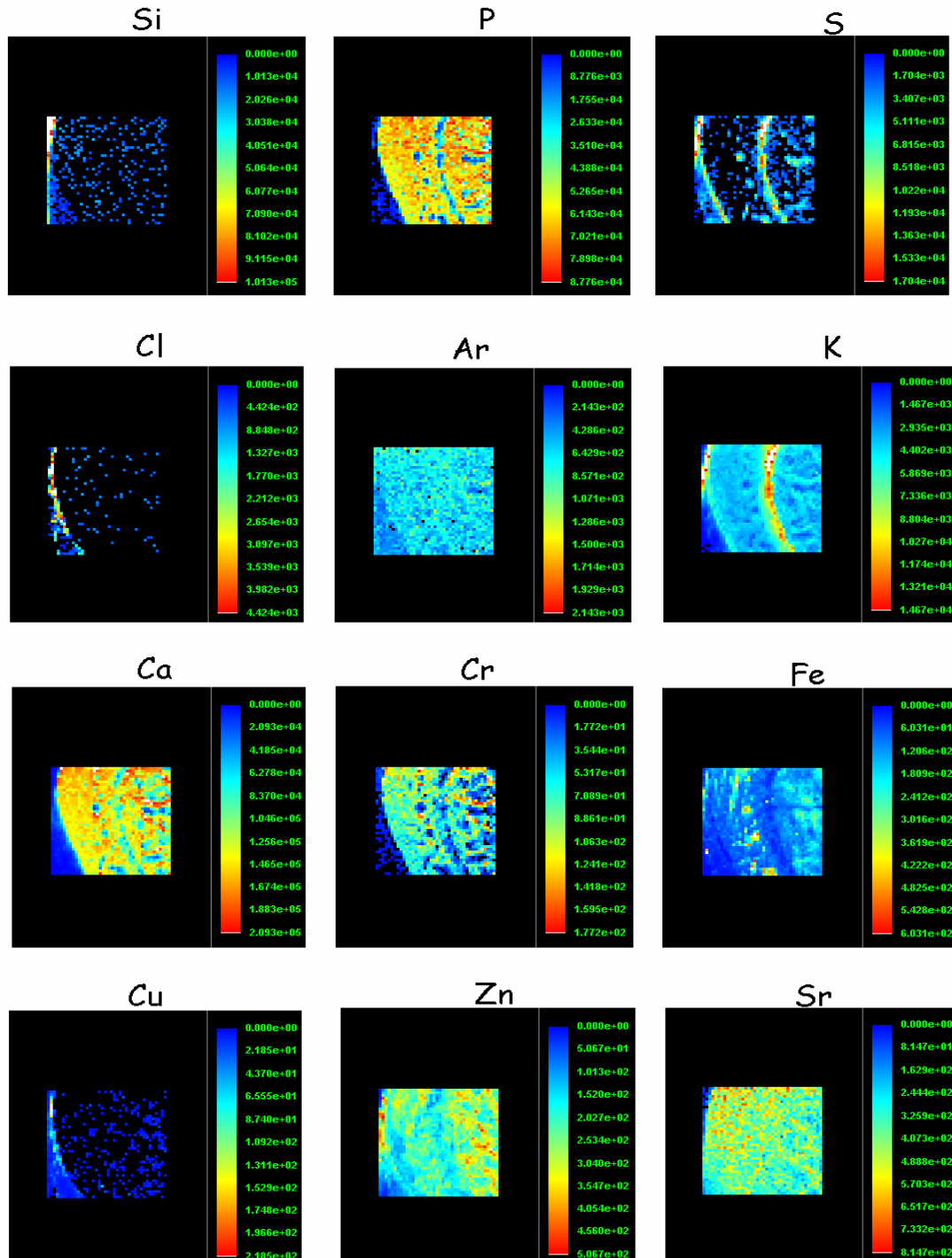


FIGURA IV.33 - EXEMPLO DAS IMAGENS DA CORTICAL, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE UMA AMOSTRA DE RATA DE CONTROLE.

Ratas Controle

(região trabecular)

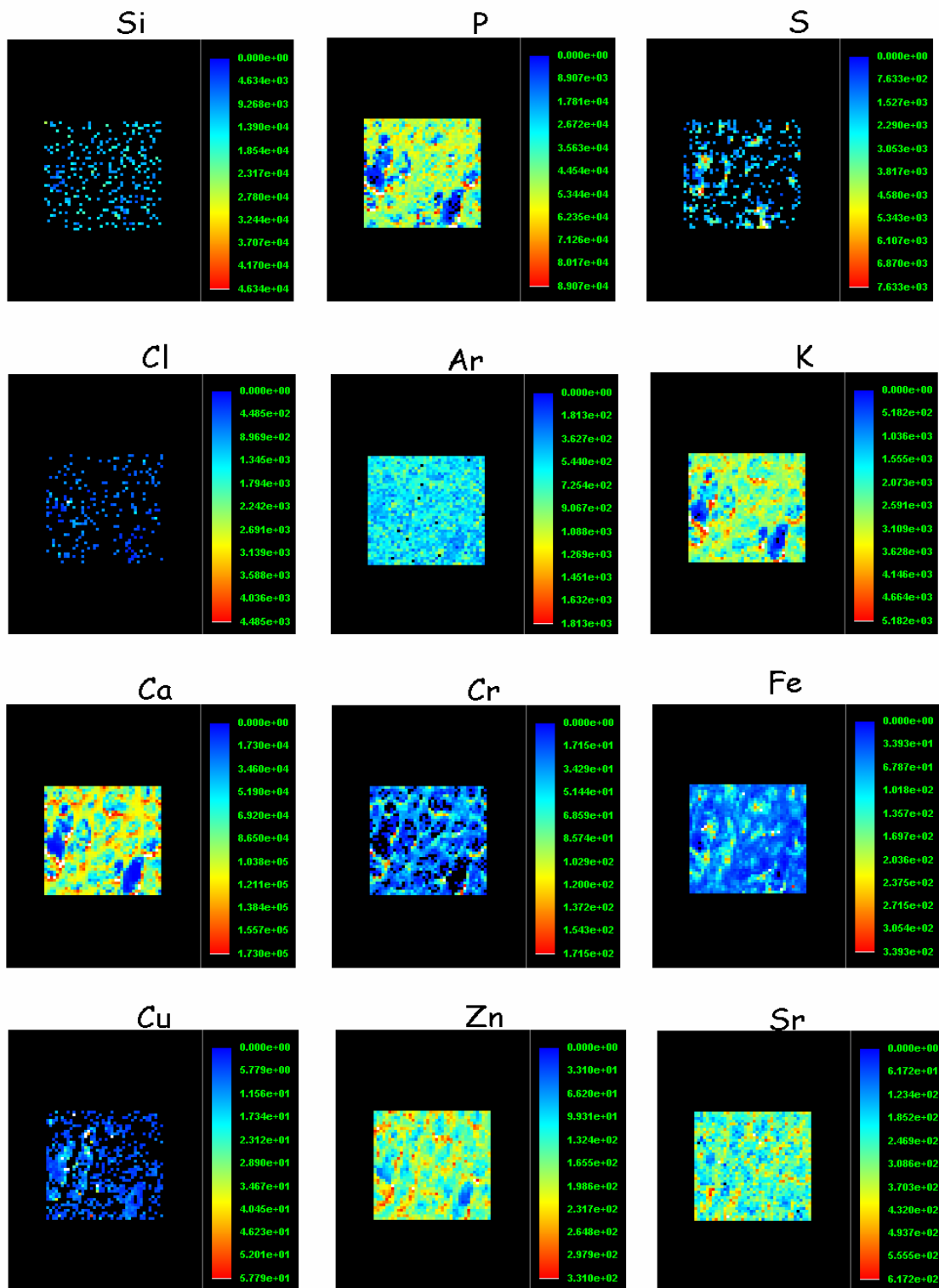


FIGURA IV.34 EXEMPLO DAS IMAGENS DA REGIÃO TRABECULAR, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE UMA AMOSTRA DE RATA DE CONTROLE.

Ratas Castradas

(regiões: cortical e trabecular)

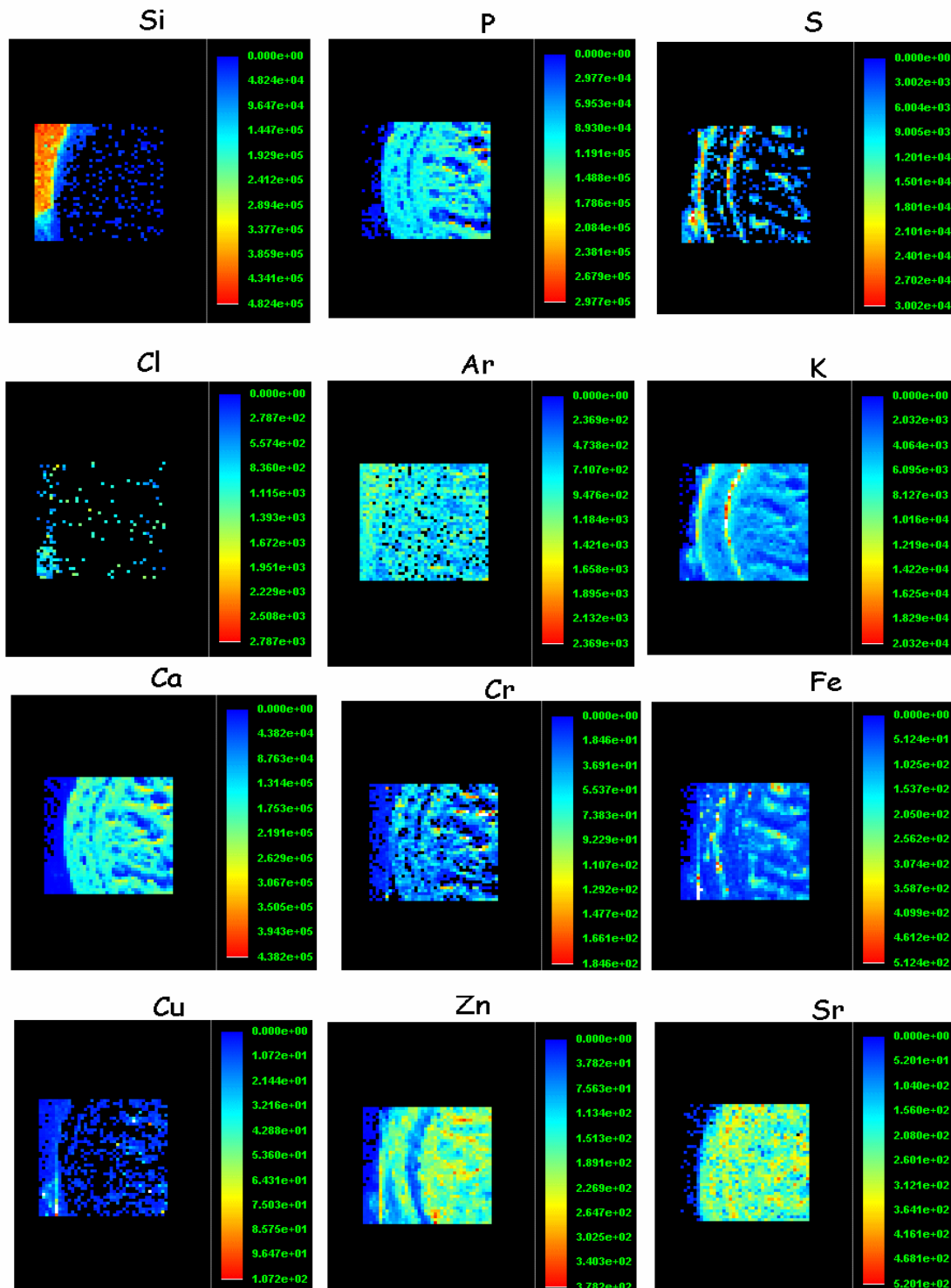


FIGURA IV.35 EXEMPLO DAS IMAGENS DE CORTICAL+TRABÉCULA, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA.

Ratas Castradas com Reposição de Estrogênio (regiões: cortical e trabecular)

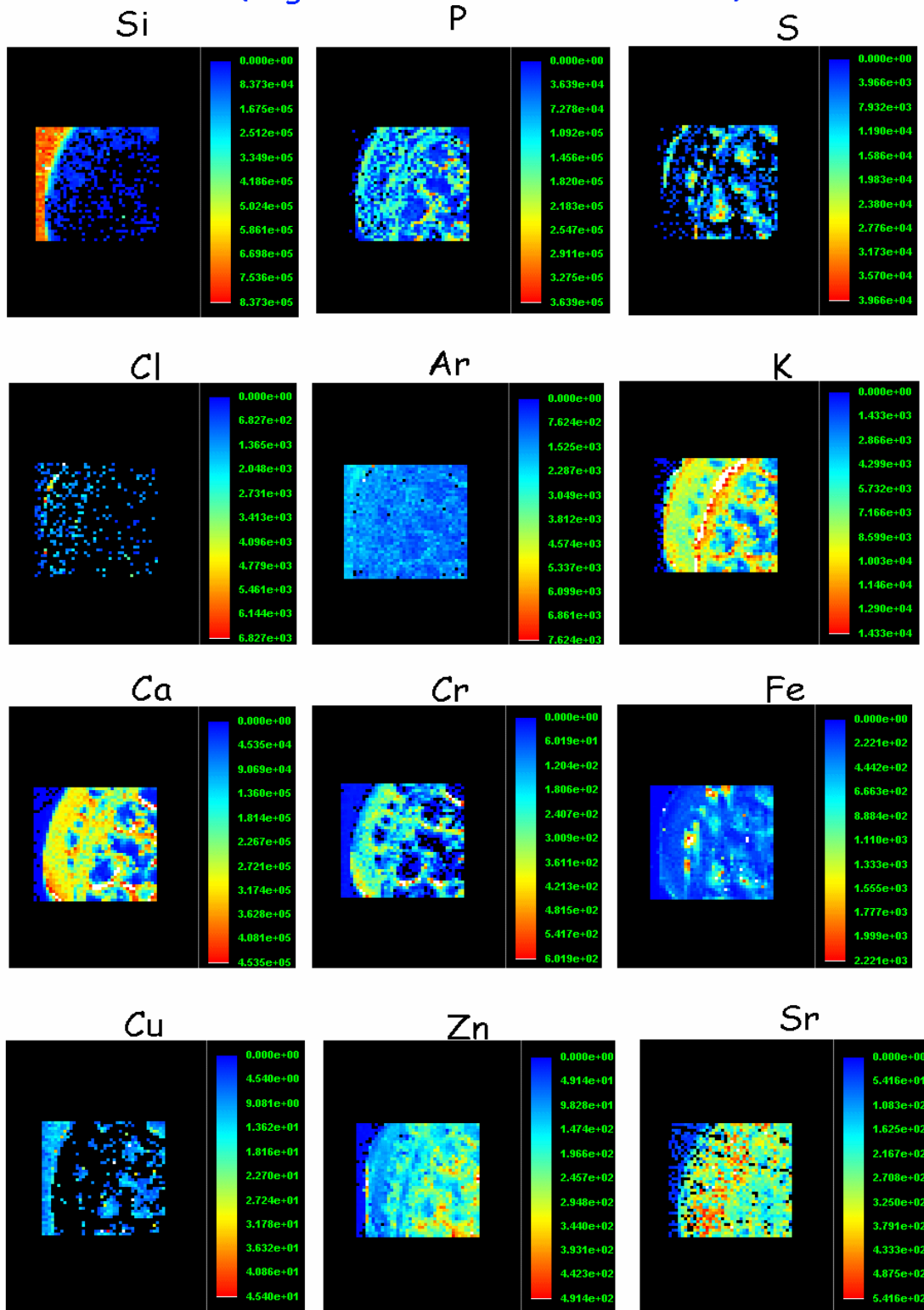


FIGURA IV.36– EXEMPLO DAS IMAGENS DE CORTICAL+TRABÉCULA, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE UMA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO.

Ratas Castradas com reposição de Estrogênio

(região trabecular)

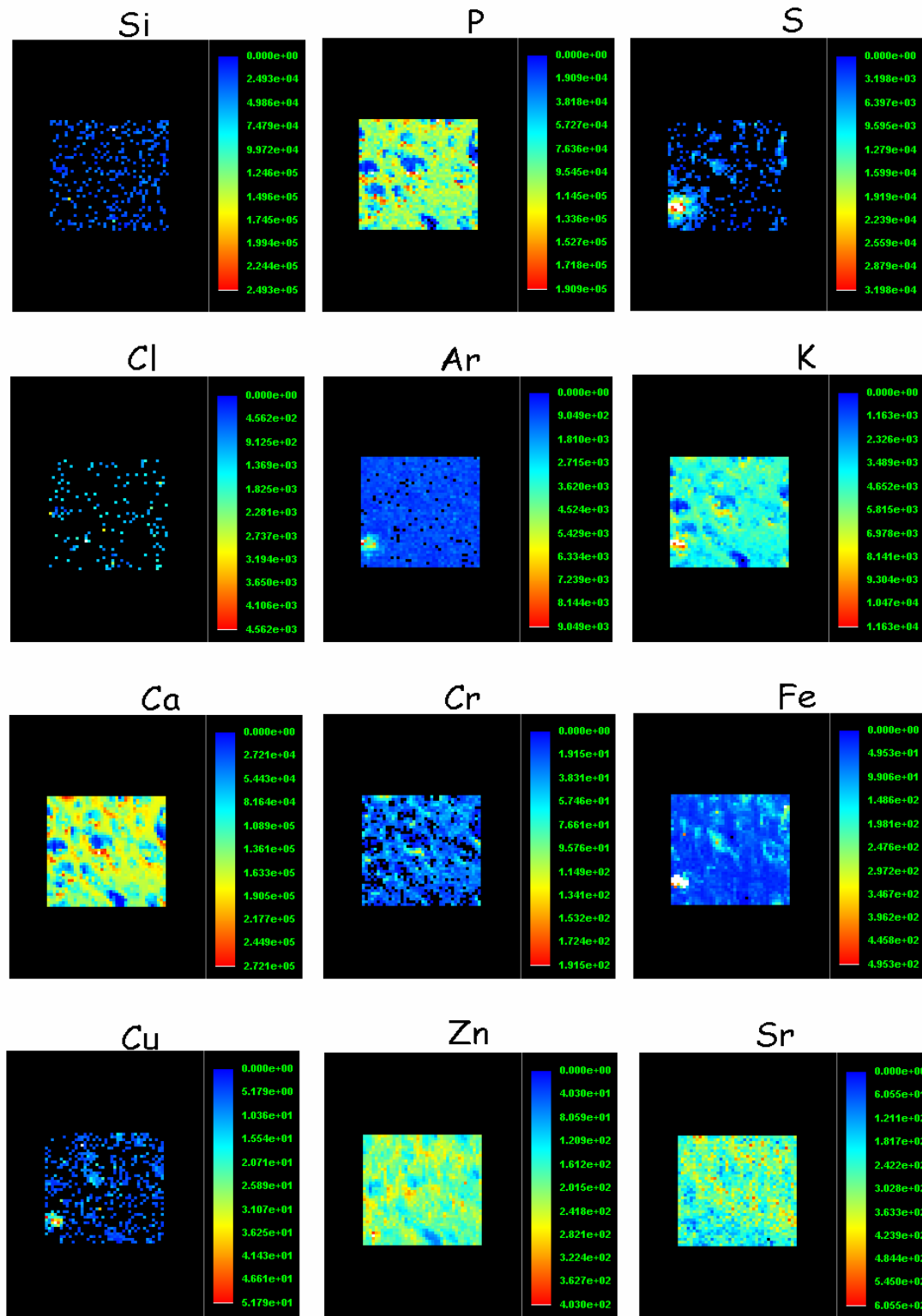


FIGURA IV.37 - EXEMPLO DAS IMAGENS DAS TRABÉCULAS, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE OUTRA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO.

Ratas Castradas com Reposição de Estrogênio (região trabecular)

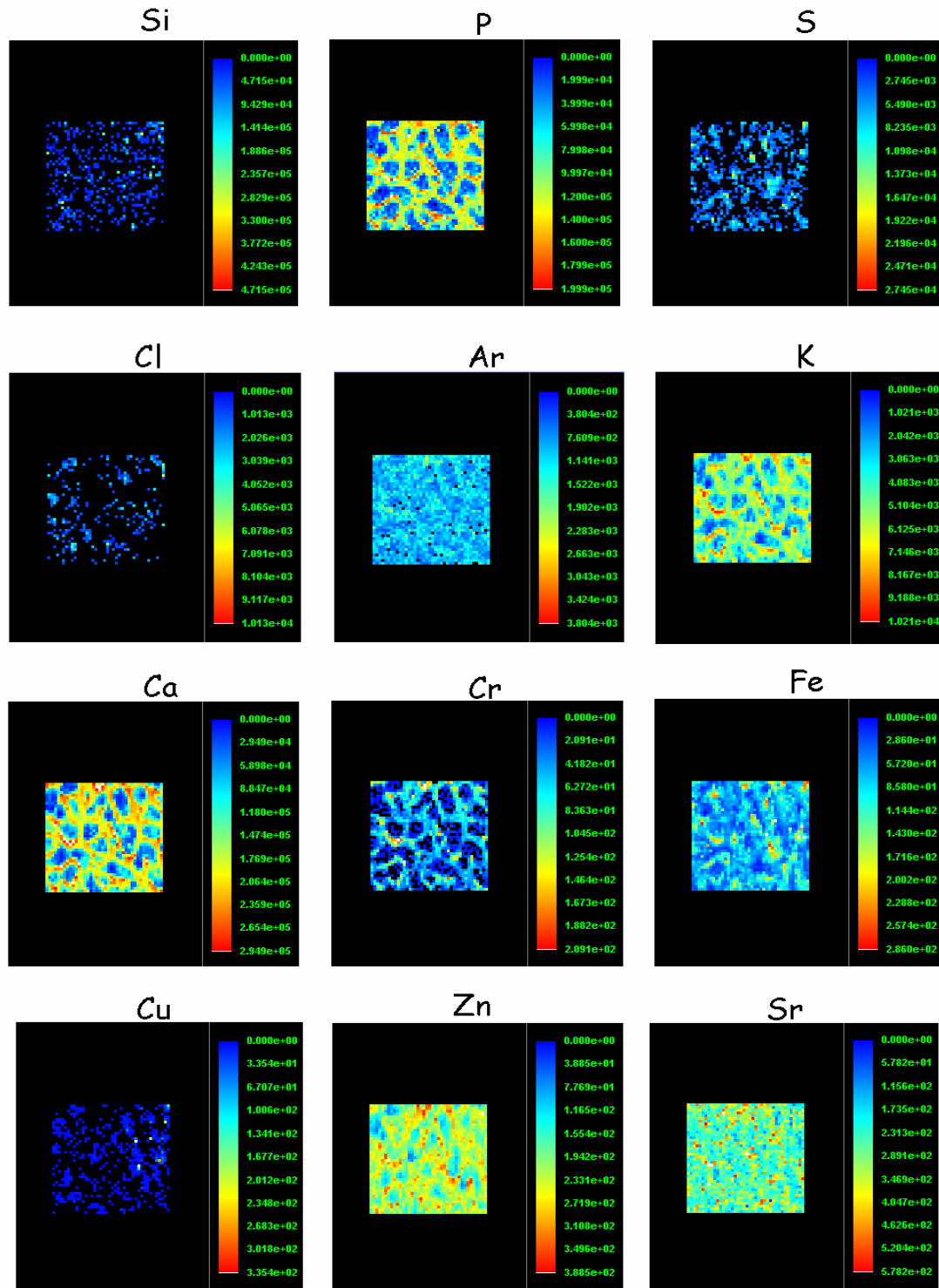


FIGURA IV.38 - EXEMPLO DAS IMAGENS DAS TRABÉCULAS, EM UNIDADE DE CONCENTRAÇÃO, DE OUTRA AMOSTRA DE RATA CASTRADA COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO.

A figura IV.39 apresenta uma comparação entre as imagens obtidas para o cálcio e o estrôncio: importantes elementos químicos no que diz respeito ao metabolismo ósseo.

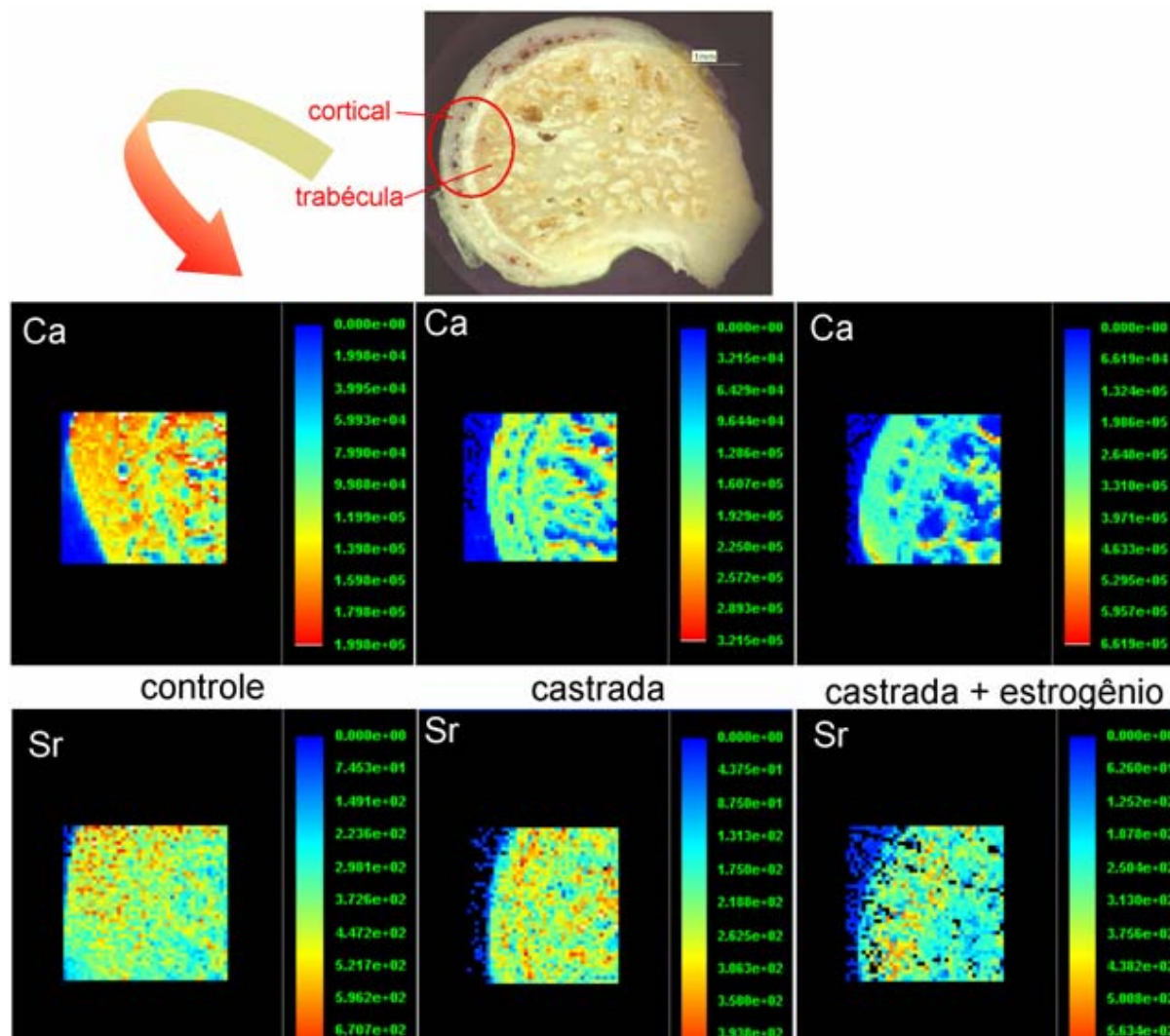


FIGURA IV.39 - COMPARAÇÃO ENTE AS IMAGENS OBTIDAS PARA O CÁLCIO E ESTRÔNCIO.

A figura IV.40 ilustra algumas imagens obtidas durante a aquisição dos dados através da técnica μ XRF-SR.

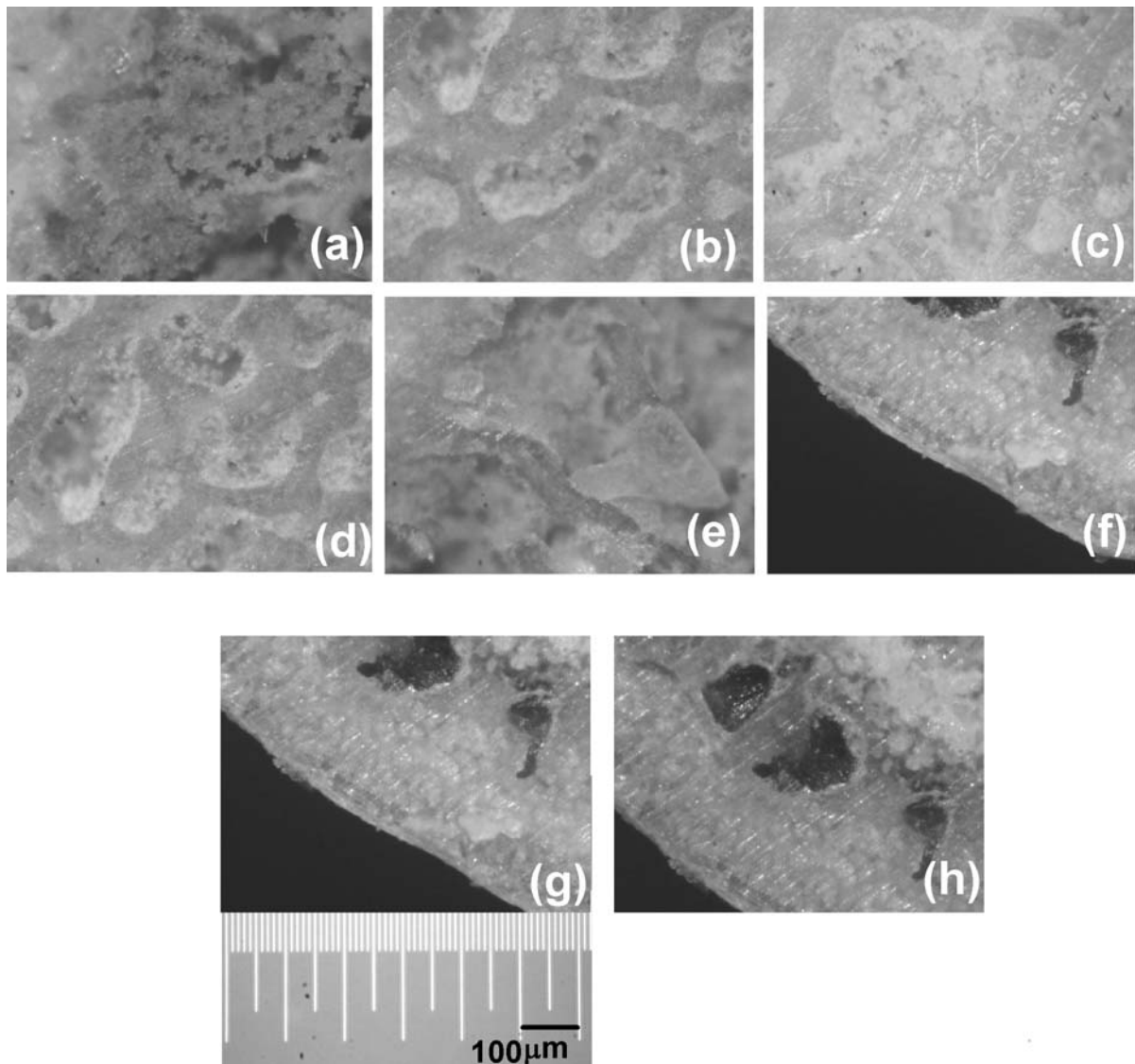


FIGURA IV.40 – EXEMPLOS DE ALGUMAS IMAGENS ADQUIRIDAS (RATAS CASTRADAS COM REPOSIÇÃO DE ESTROGÊNIO) NO MOMENTO DA AQUISIÇÃO DOS DADOS DE μ XRF-SR.

Uma vez apresentados os resultados, os mesmos irão ser analisados no capítulo seguinte (capítulo V).

CAPÍTULO V

V. Análise dos Resultados

Nesse capítulo serão apresentadas as análises dos resultados exibidos no capítulo anterior.

V.1 - Tomografia Computadorizada

Através dos resultados apresentados no capítulo anterior a μ CT se mostrou um potente e importante técnica não invasiva para analisar as estruturas internas das amostras ósseas utilizadas nos ensaios para todos os grupos analisados.

V.1.1 – Grupo 1 (animais machos e fêmeas com 3 meses de idade)

Em relação aos resultados do grupo 1, apresentados na tabela IV.2 e IV.3, nota-se que as ratas apresentam um menor valor de BV/TV, ou seja, uma porcentagem menor de osso, o que pode ser explicado pelo fato de esse grupo possuir uma maior fragmentação óssea. Outro fator importante a se observar é em relação à espessura das trabéculas que também se mostraram mais finas no grupo das fêmeas. Quando aplicado o teste estatístico “t-Student” com um intervalo de confiabilidade de 95%, verificou-se que, para os dados 2D, apenas os parâmetros BS/BV e TbTh apresentaram diferença estatisticamente considerável. Já para os dados 3D, os únicos parâmetros que não revelaram uma diferença estatisticamente significativa foram TbN. e TbSp. Como as quantificações 2D e 3D diferem apenas por esse último método se aplicar melhor à morfologia da estrutura, principalmente em relação ao parâmetro BV/TV.

Ainda em relação a esses resultados, como pode ser observado na tabela IV.1, os valores das áreas quantificadas não foram idênticas, não havendo nenhuma influência significativa nos resultados, como pode ser verificado na figura IV.1.

Com auxílio das figuras IV.3 e IV.4 podem se visualizados, principalmente nas imagens das amostras 2 e 3, tanto para as fêmeas quanto para os machos, anéis concêntricos. Esses anéis são chamados de artefatos de aquisição e são muito comuns em imagens de CT. Esse tipo de artefato ocorre por causa da não linearidade dos fotoelementos do detector em resposta à mesma luminosidade de excitação e o fato dessas não linearidades aparecerem no mesmo local, fazem com que, na projeção, apresentem um perfil de ganho. Esse perfil de ganho gera linhas verticais, no sinograma, o que o torna responsável pelo aparecimento dos artefatos na reconstrução da imagem. Uma das formas de minimizar esse problema é aplicando um filtro passa baixa. Como o processo de quantificação depende da qualidade da imagem empregada, esse procedimento de eliminação dos artefatos em círculos concêntricos se torna importante ferramenta para melhorar a imagem a ser utilizada.

V.1.2 = Grupo 2 (animais machos e fêmeas com 24 e 12 meses respectivamente, de idade:controle e submetidos ao protocolo de etanol)

Outra análise foi efetuada em relação aos valores das áreas utilizadas na quantificação dos parâmetros histomorfométricos, como pode ser visualizado na figura IV.11, representando os gráficos tipo “box-plot” das áreas, para ambos os métodos bidimensional e tridimensional. Verifica-se que a caixa contém as observações entre 25 e 75% da distribuição, ou seja, os 50% centrais. Os 25% dos dados inferiores estão representados por uma linha vertical que liga o lado abaixo da mediana à localização do menor valor. De

modo semelhante, os 25% dos dados superiores estão representados por uma linha vertical ligando o lado acima do valor mediano da caixa ao maior valor.

Um fator muito importante na quantificação óssea através da microtomografia computadorizada 3D é o nível de “threshold” (TH) utilizado para fazer a segmentação das imagens. O nível de TH tem uma influência muito grande na estrutura óssea, como pode ser visualizado na figura IV.12. Nessa figura nota-se que dependendo do valor que se possui, a estrutura estudada é segmentada de forma errada, ou seja, seus contornos não representam fielmente a imagem original. Em outras palavras pode-se dizer que quanto maior for o valor de TH escolhido mais finas ficarão as estruturas: fato que subestima, por exemplo, o valor de BV/TV (fração de volume ósseo).

De maneira semelhante, quanto menor for o valor na segmentação, mais “grossa” se apresentará a estrutura. O valor ótimo de “threshold” se encontra entre esses limites. Não existe um protocolo padrão para a determinação desse parâmetro, havendo algumas correntes, dentre as quais pode se destacadas duas. Uma das correntes vigentes baseia-se na observação visual do processo de segmentação para apurar qual o melhor valor de TH, reforçando ainda que, dependendo do percentual de variação entre seus níveis ocorrerá uma variação dos parâmetros histomorfométricos, especialmente de BV/TV, em cerca de 10%, restando saber se essa diferença é considerada estatisticamente significativa. Em outras palavras, se a escolha do valor de TH ficar entre dois extremos muito próximos, qualquer valor desse intervalo é válida, desde que a diferença nos valores de BV/TV não ultrapasse a 10%.

Uma segunda corrente em prática se baseia na derivada parcial dos valores de BV/TV em relação aos valores de “threshold” escolhidos para análise. Essa linha está fundamentada na hipótese de que quando essa derivada for igual à zero, não ocorrerão mais mudanças significativas em BV/TV e nesse momento o valor de TH está determinado. Os dois métodos foram aplicados nesse trabalho de tese e verificou-se que em alguns casos,

não aparece muito claro qual seria o valor ótimo de TH, sendo melhor fazer sua escolha pelo método da observação.

Não se pode esquecer que, na histomorfometria convencional, as quantificações são feitas de acordo com o grau de sensibilidade do técnico que está fazendo o procedimento. Já na tomografia, independente do método utilizado, a segmentação representa muito mais fielmente a imagem da amostra inspecionada, fato esse de grande importância e vantagem. Como o parâmetro BV/TV é um dos, senão o mais, principais fatores para caracterizar o osso, foi feito um estudo sobre a sua correlação com os valores de TH, apresentado na figura IV.13. Os resultados mostraram que esses parâmetros possuem uma correlação de natureza linear, negativa ($r < 0$) e forte ($r > 0,70$, quanto mais perto de 1,0 o valor de r se encontrar, mais forte será a correlação), o que informa um alto grau de associação entre as variáveis e corrobora a figura IV.12.

Em relação ao grupo 2, através das tabelas IV.5 e IV.6, verifica-se que o grupo submetido ao protocolo de etanol apresentou uma menor fração de volume ósseo tanto quando avaliado através do método 2D quanto quando utilizado o método 3D. Esse resultado revela que, para ambos os sexos, a ingestão de etanol influenciou na estrutura óssea, embora apenas alguns parâmetros secundários tenham apresentado mudanças significativas. Porém, essa última afirmativa pode ser mudada se o número amostral for aumentado, melhorando a estatística de dados. Para entender melhor os resultados comentados acima, basta levar em consideração que o etanol pode ser considerado um agente nocivo sobre as células ósseas, possuindo uma ação direta sobre as mesmas.

Se for avaliado o comportamento da estrutura óssea na diferentes situações explicitadas anteriormente, nota-se uma redução significativa nos parâmetros primários histomorfométricos, principalmente da fração de volume ósseo, revelando uma separação entre os ossos e, corroborando outros estudos associados à mudança de idade. Essa constatação é fortificada

quando é levada em consideração a remodelação óssea, isto é, durante a vida, os ossos passam constantemente por um processo de absorção e formação. Com o decorrer do tempo, o balanço entre a reabsorção e formação do osso muda, resultando numa diminuição de tecido ósseo assim como o conteúdo mineral que, com a diminuição, tornam os ossos menos densos e mais frágeis. Com a idade, a cartilagem (tecido que protege os ossos evitando o atrito entre eles), diminui seu conteúdo de água tornando-a mais susceptível ao esforço, o que é de extrema importância, com a degeneração da cartilagem, é possível haver o desenvolvimento da artrite.

Outro fato relevante em relação às mudanças ocorridas no osso com respeito à mudança de idade é a falta de flexibilidade óssea, ou seja, com o avanço da idade, os ligamentos, que são formados pelo tecido conjuntivo entre os ossos, tornam-se menos elásticos, fazendo com que ocorra a redução da flexibilidade.

V.1.3 – Grupo 3 (biópsias humanas)

Um outro aspecto que merece destaque é a utilização da técnica de μ CT na caracterização de biópsias ósseas humanas (amostras pertencentes ao grupo de estudo número três, explicitado no item III.1). O estudo dessas amostras foi calcado no mesmo procedimento utilizado na análise da amostras de osso de rato, que por sua vez está baseado na teoria histomorfométrica. Com isso, foi possível obter os resultados apresentados na tabela IV.6 e IV.7, mostrando que através dessa técnica foi possível fazer a caracterização dessas amostras.

V.2 - Fluorescência de Raios X

V.2.1 – EDXRF

Os resultados apresentados nas figuras IV.20, IV.21, IV.23 e IV.24 e na tabela IV.9 demonstram que as concentrações dos elementos encontrados nas amostras ósseas diferem dependendo do gênero, idade e o sítio do fêmur analisado. É importante salientar que a técnica de XRF é um método analítico superficial e, portanto, uma extrapolação dos resultados para as regiões mais internas do osso deve ser tentada. Foi investigado também a correlação entre os elementos, apresentados na tabela IV.11. Através desses resultados é possível verificar que existe uma forte correlação entre os seguintes elementos: S-Cl, S-K, S-Fe, S-Cu, S-Zn, S-Rb, S-Sr, Cl-K, Cl-Cu, Cl-Zn, Cl-Rb, Cl-Sr, Ar-Cu, K-Ca, K-Zn, K-Rb, Ca-Zn, Ca-Rb, Mn-Ni, Fe-Cu, Fe-Rb, Fe-Sr, Cu-Sr e Zn-Rb. Pela própria função e característica de cada elemento, algumas correlações já eram esperadas, tais como Cl-K, K-Ca e S-Fe. O elemento argônio é proveniente do ar e, portanto, não faz parte da amostra analisada.

Os resultados da figura IV.24 revelam que o tratamento com etanol interferiu significativamente nas concentrações elementares nas amostras analisadas, assim como os resultados da caracterização da estrutura óssea através da microtomografia computadorizada, revelados anteriormente nesse capítulo.

A função de alguns elementos nos ossos é conhecida como por exemplo a do Ca, P, Sr e Zn; outras ainda não foram elucidadas.

Algumas considerações podem ser feitas em relação aos elementos encontrados levando em consideração os resultados apresentados na tabela IV.11. São elas:

Enxofre (S) – aparece principalmente em forma de sulfato (com o Ca e o Sr, por exemplo) e em composições orgânicas do osso. É extremamente útil na formação óssea e estabilização da matriz do tecido conectivo, podendo até frear a degeneração das articulações. Logo, seu excesso pode comprometer o crescimento.

Estrôncio (Sr) – O estrôncio tem um efeito benéfico para o osso. De acordo com [140] in vivo estudo demonstraram que esse elemento aumenta a replicata das células preosteoblasticas e, estimula a formação óssea. De acordo com [141], o estrôncio tem uma grande afinidade para com o osso. De acordo com [142] o estrôncio é distribuído de forma heterogênea no osso ,tanto na região cortical quanto na trabecular (o que corrobora os resultados encontrados nesse trabalho), obtendo uma maior concentração na região de formação do osso (mais no tecido ósseo novo que no velho).

Cálcio (Ca) – é um mineral essencial da composição dos ossos fazendo inúmeras funções primordiais no corpo dos quais 99 % do todo elemento se encontra localizado no osso. Outro fato relevante de lembrar consiste na competição entre esse elemento e o ferro.

Ferro (Fe) – necessário para o sistema sangüíneo (significativo para transporte de oxigênio) e associado a sua deficiência está o crescimento reduzido. Grande parte desse elemento fica armazenado na medula óssea.

Cobre (Cu) – tão necessário para a contribuição do sangue como para a construção de vários sistemas enzimáticos. O cobre é necessário para a maturação do colágeno, para a formação da elastina e para o crescimento ósseo.

Zinco (Zn) – promove a liberação do hormônio do crescimento e participa da estrutura dos ossos.

Manganês (Mn) – importante para o desenvolvimento ósseo. É um elemento essencial do corpo uma vez que está envolvido na ativação de enzimas e na formação dos ossos e cartilagens. Sua deficiência pode causar distúrbios no metabolismo, caracterizados por ossos e cartilagens frágeis, desenvolvendo fraqueza nos ossos e tremores simulando Parkinson;

Níquel (Ni) – tem sido classificado como um elemento importante ao desenvolvimento, o que vem a explicar seu decréscimo com o avanço da idade, porém sua função no metabolismo ainda não está estabelecida.

V.2.2 – μ XRF-SR

Através dos perfis (figuras IV.28, 29 e 30) apresentados podem ser feitas as seguintes observações:

i) Com relação ao Si, nota-se que o mesmo possui concentração apenas fora da região óssea, ressaltando que esse elemento é proveniente apenas da fita adesiva utilizada para fixar as amostras em seus suportes, no momento das medições.

ii) O elemento fósforo possui o mesmo comportamento em todos os grupos analisados, porém com diferentes concentrações, cujos valores médios se mostraram maiores no grupo de ratas castradas com reposição de estrogênio mais pronunciados na região trabecular.

iii) O enxofre se apresentou muito mais concentrado na região de interface entre a cortical e a região trabecular colaborando para um efeito protetor. Esse fato pode ser claramente observado nas imagens das figuras IV.31 a IV.35). Esse fato pode ser explicado pela relação que esse elemento possui com as articulações (manutenção da elasticidade e da flexibilidade), não existindo (ou se existir, em concentrações muito baixas) na região das trabéculas e sim se localizando mais na parte externa do osso. Outra observação interessante a ser notada é a parte quantitativa da concentração desse elemento, se mostrando na seguinte ordem de crescente: ratas controle < ratas castradas < ratas castradas com reposição de estrogênio.

iv) Pode-se notar que a concentração de potássio aumenta no sentido externo da amostra, ou seja, de dentro da região trabecular para a região cortical. Deve ser notado que para os animais com reposição de estrogênio, as concentrações desse elemento nas trabéculas diminuíram e não obtiveram o mesmo perfil que dos animais controle.

v) O cálcio está presente em todas as regiões analisadas, se revelando uma menor concentração nas ratas castradas.

vi) Tem-se um perfil semelhante com respeito ao cromo, com um pico bem pronunciado na região trabecular.

vii) Picos de ferro são observados justamente nas regiões internas das trabéculas (região medular) com uma maior concentração nas ratas controle.

viii) Após a castração e a reposição de estrogênio o elemento cobre não foi repostado se apresentando em concentrações bem menores embora seus perfis sejam semelhantes.

ix) A concentração de zinco foi visivelmente afetada com a castração e ainda mais com a reposição de estrogênio, se concentrando mais na região trabecular.

x) Os perfis do estrôncio estão diferentes dos do cálcio, embora os resultados anteriores de EDXRF corroborem os da μ XRF-SR, isto é, em ambas as técnicas foi possível observar, através de investigações correlacionais e análise de perfis e imagens, que os elementos não possuem igual comportamento de distribuição.

xi) Nota-se ainda, que a espessura da cortical é modificada nos três grupos analisados: uma redução considerável no processo de castração e depois com a reposição de estrogênio, um aumento da mesma. Esse fato e os outros apresentados anteriormente revelam que o processo de castração reduz tanto os minerais quanto a estrutura óssea e que quando tratadas com reposição de estrogênio, algumas características são compensadas, inclusive o alargamento da região cortical.

As modificações que ocorrem com a queda de estrógenos levam a um remodelamento onde há maior número de osteoclastos e cada um produz uma cavidade mais profunda; também há aumento da atividade dos osteoblastos que tentam corrigir o defeito, mas não conseguem, caracterizando o remodelamento acelerado onde a atividade de reabsorção é maior e, no final de cada ciclo, haverá um declínio significativo de massa óssea - osteoporose da pós-menopausa. Em outras palavras, pode-se dizer que a prevalência e osteoporose, que é caracterizada pela baixa massa óssea, pode ser devido a deficiência de estrogênio, causando um balanço negativo entre a reabsorção e a formação óssea, conforme pode ser visto por [143].

CAPÍTULO VI

VI. Conclusão

Através dos resultados obtidos verifica-se que, com auxílio das técnicas de microtomografia computadorizada 3D e fluorescência de raios X, tanto EDXRF quanto μ XRF-SR, é possível caracterizar amostras porosas, tal como osso.

A μ CT-3D é capaz de avaliar a estrutura interna das amostras ósseas com resolução da ordem de 15 μ m dependendo da magnificação utilizada no ensaio. Com isso foi possível caracterizar tais estruturas e verificou-se que com o aumento da idade, a região interna da cabeça femoral sofre um desgaste no afinamento de suas travessuras ósseas e principalmente em relação ao volume percentual ósseo. Através dessa mesma técnica, foi possível avaliar o grau de comprometimento ósseo que a ingestão de etanol produz, sendo verificado uma alta influência desse protocolo na deterioração de toda estrutura óssea, provando a ação nociva da droga no osso podendo, inclusive, dependendo do consumo, causar uma osteoporose.

Com auxílio da XRF foi possível encontrar os principais elementos químicos que compõem as superfícies ósseas analisadas. Com essa técnica, encontrou-se que o cálcio, mineral de mais alta concentração e importância no osso, possui uma menor concentração nos animais com idades mais avançadas, o que mostra sua relação direta com as avaliações das estruturas ósseas, deixando-os mais fracos e sujeitos à fratura. Essa perda de cálcio pode estar ligada ao paratormônio, uma vez que o mesmo regula a taxa de cálcio, estimulando sua remoção da matriz óssea. Outro dado importante de mencionar é em relação aos animais submetidos ao protocolo de castração e reposição de estrogênio. Para tal, conclui-se que o procedimento da castração, em um intervalo e tempo de 4 meses, foi capaz de reduzir o percentual de

cálcio aumentando o de estrôncio e a espessura da cortical da cabeça femoral, enquanto que a reposição de estrogênio conseguiu elevar novamente esses percentuais voltando a definir de forma mais clara a cortical femoral.

De uma forma geral, pode ser observado que as técnicas utilizadas nesse trabalho são alternativas para realizar a investigação em estruturas ósseas e complementares entre si. A microtomografia fornece informações sobre as estruturas interna e externa dos ossos bem como sua visualização tridimensional, já a técnica de fluorescência de raios X contribui para a elucidação dessas estruturas no sentido de revelarem os elementos presentes nas superfícies das amostras bem como a representação visual das concentrações dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] HESSENBRUCH, A. "A brief history of x-rays". *Endeavour*, 26(4), 137-141, 2002.
- [2] WEBSTER, E. "X-rays in diagnostic radiology". *Health Physics*. 69, 610-635.
- [3] LIN, C.L. *et al.* "3D characterization and analysis of particle shape using x-ray microtomography (XMT)". *Powder Technology*. 154, 61-69, 2005.
- [4] FLANNERY, B. *et al.* "Three-Dimensional x-ray microtomography". *Science*. 237, 1439-1444, 1987.
- [5] MORTON, E.J. *et al.* "Three-Dimensional x-ray microtomography for medical and biological applications". *Physics in Medicine and Biology*. 35(7), 805-820, 1990.
- [6] TABOR, Z. "Analysis of the influence of image resolution on the discriminating power of trabecular bone architectural parameters". *Bone*. 34(1), 170-179, 2004.
- [7] YANG, J. *et al.* "High Resolution Micro-CT evaluation of mid to long term effects os estrogen deficiency on rat trabecular bone". *Academic Radiology*. 10, 1153-1158, 2003.
- [8] BJORN DAL, L. *et al.* "External and internal macromorphology in 3D-reconsructed maxillary molars using computerized x-ray microtomography". *International Endodontic Journal*. 32, 3-9, 1999.
- [9] WANG, G. *et al.* "Iterative x-ray cone beam tomography for metal artifact reduction and local region reconstruction". *Microscopy and Microanalysis*. 5, 58-65, 1999.
- [10] SAKELLARIOU, A *et al.* "X-ray tomography for mesoscale physics applications". *Physica A*. 339, 152-158, 2004.
- [11] MARTÍN-BADOSA, E. *et al.* "A method for the automatic characterization of bone architecture in 3D mice microtomographic images". *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 27, 447-458, 2003.
- [12] HANSON, N.A. *et al.* "Alternative approach to assessment of bone quality using micro-computed tomography". *Bone*. 35, 326-333, 2004.

-
- [13] PATEL, V. *et al.* "Micro-CT evaluation of normal and osteoarthritic bone structure in human knee specimens". *Journal of Orthopaedic Research*. 21, 6-13, 2003.
- [14] HARA, T. *et al.* "The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties". *Bone*. 31(1), 107-109, 2002.
- [15] RÜEGSEGG P. *et al.* "Comparison of structure extraction methods for in vivo trabecular bone measurements." *Computerized Medical Imaging and Graphics*. 23,:69-74;1999.
- [16] LOVERIDGE, N. *et al.* "Bone mineralization density and femoral neck fragility". *Bone*. 35, 929-941, 2004.
- [17] RAO, D. V. *et al.* "Microtomographic images of rat's lumbar vertebra microstructure using 30 keV synchrotron x-rays: an analysis in terms of 3D visualization". *Nuclear Instruments. & Methods. In Physics. Research. Section .A*. 523, 206-16, 2004.
- [18] BARBIER, A. *et al.* "The visualization and evaluation of bone architecture in the rat using three-dimensional x-ray microcomputed tomography". *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 17, 37-44, 1999.
- [19] THOMSEN, J. *et al.* "Zone dependent changes in human vertebral trabecular bone: clinical applications". *Bone*, 30(5), 664-669, 2002.
- [20] MOSEKILDE, I. "Aging of Bone". *Review in Clinical Gerontology*. 8, 281-296, 1998.
- [21] LIM, S. *et al.* "Body composition changes with age have gender specific impact in bone mineral density". *Bone*, 35, 792-798, 2004.
- [22] THOMSEN, J. *et al.* "Static Histomorphometry of human Iliac Crest and Vertebral trabecular bone: a comparative study". *Bone*. 30(1), 267-274, 2002.
- [23] DING, M. *et al.* "Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by micro-CT scanning". *Journal of Biomechanics*. 32, 323-326, 1999.
- [24] DING, M. *et al.* " Age-related variations in the microstructure of human tibial cancellous bone". *Journal of Orthopaedic Research*. 20, 615-621, 2002.
- [25] DING, M. *et al.* "Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone". *Bone*. 26(3), 291-295, 2000.

- [26] NYQUIST F. *et al.* "Biochemical Markers of Bone Metabolism After Short and Long Time Ethanol Withdrawal in Alcoholics". *Bone*. 19(1), 51-54, 1996.
- [27] NYQUIST F. *et al.* "Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats". *Alcohol & Alcoholism*. 37(1), 21-24, 2002.
- [28] KANIS, J.A. *et al.* "Alcohol intake as a risk factor for fracture". *Osteoporosis Int.* 16, 737-742, 2005.
- [29] DYER, A.S. *et al.* "Magnesium levels in alcohol-treated rodents using different consumption paradigms". *Alcohol*. 16(3), 195-199, 1998.
- [30] FLINK, E.B. "Magnesium deficiency in alcoholism". *Alcoholism*. 10, 590-594, 1986.
- [31] GLINDER, E. M. *et al.* "Colorimetric determination of bound 'calmagite' of magnesium in human blood serum". *Clinical Chemistry*. 17, 662-667, 1971.
- [32] BARAN, D.T. *et al.* "Effect of alcohol ingestion on bone and mineral metabolism in rats". *The American Journal of Physiology*. 238, E507-E510, 1980.
- [33] CRILLY, R.G. *et al.* "Bone histomorphometry, bone mass and related parameters in alcoholic males". *Calcified Tissue International*. 44, 269-276, 1988.
- [34] SPENCER, H. *et al.* "Chronic alcoholism. Frequently overlooked cause of osteoporosis in men". *The American Journal of the Medical Sciences*. 80, 393-397, 1986.
- [35] LINDSELL, D.R. *et al.* "Fractures on the chest radiograph in the detection of alcoholic liver disease". *Br. Med. J.* 285, 597-599, 1982.
- [36] OPPENHEIM, W.L. "The battered alcoholic syndrome". *The Journal of Trauma*. 17, 850-856, 1977.
- [37] SEEMAN, E. *et al.* "Risk factors for spinal osteoporosis in men". *The American Journal of Medicine*. 75, 977-983, 1983.
- [38] WILKINSON, G. *et al.* "Metabolic bone disease and fractures in male alcoholics: a pilot study". *The British Journal of addiction to alcohol and other drugs*. 80, 65-68, 1985.
- [39] LIEBER, C.S. *et al.* "Liquid diet technique of ethanol administration". *Alcohol Alcohol*. 24, 197-211, 1989.
- [40] LEBER, C,S, *et al.* "Experimental methods of ethanol administration". *Journal of Hepatology*. 10, 501-510, 1989.

- [41] PREEDY, V.R. *et al.* "Effect of chronic ethanol consumption and pair feeding on rates of protein synthesis and nucleic acid composition in rat tibia". *Alcohol Alcohol.* 27, 29-37, 1992.
- [42] SANTOLARIA, F. *et al.* "Osteopenia assessed by body composition analysis is related to malnutrition in alcoholic patients". *Alcohol.* 22, 147-157, 2000.
- [43] KANIS, J. A. *et al.* "Assessment of fracture risk". *Osteoporosis International.* 16, 581-589, 2005.
- [44] MELLO, L.C.P. *et al.* "Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar". *Revista Brasileira de Nutrição.* 18(5), 593-600, 2005.
- [45] KALU, D.N. "The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss". *Journal of Bone and Mineral Research.* 15(3), 175-191, 1991.
- [46] LANE, N.E. *et al.* "The effects of Synthetic Conjugated Estrogens, A(Cenestin) on trabecular bone structure and strength in the ovariectomized rat model". *Osteoporosis International.* 13, 816-823, 2002.
- [47] BAGI, C.M. *et al.* "Morphological and Structural characteristics of the proximal femur in human and rat". *Bone.* 21(3), 261-267, 1997.
- [48] BARKA, C.G. "The Spectra of the fluorescent Roentgen Radiations". *Phil. Mag.* 22, 396-412, 1911.
- [49] GIAUQUE, R.D. *et al.* "Trace element determination with semiconductor Detector x-ray spectrometers". *Analytical Chemistry.* 45, 671-681, 1973.
- [50] HAMMERLE, R.H. *et al.* "Test of x-ray fluorescence spectrometry as a method for analysis of atmospheric aerosols". *Analytical Chemistry.* 45(11), 1939-1940, 1973.
- [51] CRISS, J.W. *et al.* "Calculation methods for fluorescent x-ray spectrometry empirical coefficients vs. fundamental parameters". *Analytical Chemistry.* 40(7), 1080-1086, 1968.
- [52] BRADLEY, D.A. *et al.* "XRF and the In vivo evaluation of toxicological metals". *X-ray Spectrometry.* 28, 270-274, 1999.
- [53] TODD, A.C. *et al.* "Variability in XRF-measured tibia lead levels". *Physics in Medicine and Biology.* 45, 3737-3748, 2000.
- [54] PANTERBURG, F. J. *et al.* "The Fundamental Parameter Method applied to x-ray fluorescent analysis with Synchrotron radiation". *Nuclear Instruments. &*

Methods. In Physics. Research. Section B, Beam interations with materials and atoms. B68, 125-132, 1992.

[55] MORGENSTEIN, M *et al.* "Using portable energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) analysis for on-site study of ceramic sherds at El Hibe, Egypt". *Journal of Archaeological Science.* 32(11), 1613-1623, 2005.

[56] PLUMMER, T.W. "Provenancing of Hominid and Mammalian fossils from Kanjera, Kenya, using EDXRF". *Journal of Archaeological Science.* 21, 553-563, 1994.

[57] PERRING, L. *et al.* "Rapid quantification of iron, copper and zinc in food premixes using energy dispersive X-ray fluorescence". *Journal of Food Composition and Analysis.* 18(7), 655-663, 2005.

[58] PINHEIRO, T. *et al.* "Pollution assessment in the Trance river basin (Portugal) by PIXE, EDXRF and isotopic analysis". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B.* 150(1-4), 306-311, 1999.

[59] CARVALHO, M. L. *et al.* "Analysis of human teeth and bones from the chalcolithic period by X-ray spectrometry". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B.* 168(4), 559-565, 2000.

[60] SANCHÉZ, H. *et al.* "XRF analysis of arsenic uptaking in mice organs and tissues". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B.* 124(1), 140-1421, 1997.

[61] HOMMA, S. *et al.* "Site-specific distribution of copper, selenium, and zinc in human kidney by synchrotron radiation induced x-ray fluorescence". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B.* 103, 229-232, 1995.

[62] KIM, R. *et al.* "K x-ray fluorescence measurements of bone lead concentrarion: the analysis of low-level data". *Physics in Medicine and Biology.* 40, 1475-1485, 1995.

[63] OZDEMIR, Y. A. *et al.* "Qualitative and quantitative analysis of pathological and non-pathological human bone using radioisotope x-ray fluorescence technique". *Journal of quantitative Spectroscopy.* 78, 55-60, 2003.

[64] OZDEMIR, Y. A. *et al.* "Qualitative and quantitative analysis of bones in adult rats by repeated intraperitoneal administration of paclitaxel (taxol) using radioisotope EDXRF technique". *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer.* 78(3-4), 455-461, 2003.

- [65] CARVALHO, M.L. *et al* "Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence". *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 59 (8), 1251-1257, 2004.
- [66] SCANCAR, J. *et al*. "Determination of trace elements and calcium in bone of the human iliac crest by atomic absorption spectrometry". *Clinica Chimica Acta*. 293, 187-197, 2000.
- [67] HAVRILLA, G.J. "Applications of X-ray microfluorescence to materials analysis", *X-Ray Spectrometry*, 26, 364-373, 1987.
- [68] KANNIGIEER, B. "Quantification procedures in micro X-ray fluorescence analysis", *Spectrochimica Acta Part B*, 58, 609-614, 2003.
- [69] Vittiglio, G. *et al*. "Compact μ -XRF spectrometer for (in situ) analyses of cultural heritage and forensic materials". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*. 213, 693-698, 2004.
- [70] GORDON, B.M. *et al*. "Design criteria and sensitivity calculations for multielemental trace analysis at the NSLS X-ray microprobe", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. 10/11, 293-298, 1985.
- [71] BARYSHEV, V.B. *et al*. "Review of X-ray fluorescent analysis using synchrotron radiation", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. 246, 739-750, 1986.
- [72] PELLA, P.A. *et al*. "Highlights of x-ray spectrometry for microanalysis". *Spectrom*. 26, 327-332, 1997.
- [73] THOMPSON, A.C. *et al*. "Elemental measurements with an X-ray micropobe of biological and geological samples with fentogram sensitivity", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, 266, 318-323, 1988.
- [74] PAPADOPOULOU, D.N. *et al*. "Development and optimization of a portable micro-XRF method for in situ multi-element analysis of ancient ceramics". *Talanta*, 68(5), 1692-1699, 2006.
- [75] SCHEIDEGGER A.M. *et al*. "Micro-spectroscopic investigations of highly heterogeneous waste repository materials". *Journal of Geochemical Exploration*, 88(1-3), 59-63, 2006.
- [76] KEMPENAERS L. *et al*. "The use of synchrotron micro-XRF for characterization of the micro-heterogeneity of heavy metals in low-Z reference materials". *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 55(6), 651-669, 2000.

- [77] FLYNN J. *et al.* "Evaluation of X-ray microfluorescence spectrometry for the elemental analysis of firearm discharge residues". *Forensic Science International*. 97(1), 21-36, 1998.
- [78] RINDBY A. *et al.* "Micro-distribution of heavy elements in highly inhomogeneous particles generated from μ -beam XRF/XRD analysis". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 124(4), 591-604, 1997.
- [79] HUANG, Y.Y. *et al.* "Study of human bone tumor slice by SRXRF microprobe". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*. 467, 1301-1304, 2001.
- [80] GERHARDSSON L. *et al.* "Lead concentrations in cortical and trabecular bones in deceased smelter workers". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 19(2-3), 209-215, 2005.
- [81] BÁRÁNY E. *et al.* "Relationships between trace element concentrations in human blood and serum". *Toxicology Letters*. 134(1-3), 177-184, 2002.
- [82] BARANY E. *et al.* "Trace element levels in whole blood and serum from Swedish adolescents". *Sci Total Environ*. 286(1-3), 129-41, 2002.
- [83] JANEZ, *et al.* "Determination of trace elements and calcium in bone of the human iliac crest by atomic absorption spectrometry". *Clinica Chimica Acta*, 293(1-2), 187-197, 2000.
- [84] HOMMA, S. *et al.* "Site-specific distribution of copper, selenium, and zinc in human kidney by synchrotron radiation induced X-ray fluorescence". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*. 103(2), 229-232, 2005.
- [85] FUKUMOTO, N. *et al.* "X-ray fluorescent spectroscopy with a focused X-ray beam collimated by a glass capillary guide tube and element mapping of biological samples". *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 54(1), 91-98, 1999.
- [86] ATTAELMANAN, A. *et al.* "A table-top x-ray microbeam scanning facility". *Rev. Sci. Instrum*. 65 (1), 7-12, 1994.
- [88] BRECHER, R. *et al.* "The rays: A history of radiology in the United States and Canada, Baltimore: Williams and Wilkins", 1969.
- [89] KAPLAN I. *et al.* "Física Nuclear". Addison-Wesley Publishing Company, USA, 1962.

- [90] TAUHATA L. et al. "Radioproteção e Dosimetria: fundamentos". CNEN, RJ, 1999.
- [91] STEGEMANN. D. "Radiografia e Radiocospia Técnica de Microfoco", forschungszentrum Jülich, Alemanha, 1995.
- [92] GRODZINS, L. "Optimum energies for x-ray transmission tomography of small samples". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*. 206(3), 541-545, 1983.
- [93] EISBERG, R. RESNICK, R. "Quantum Physics". John Wiley & Sons Inc., New York, 1974.
- [94] KNOLL, G. F. "Radiation Detection and measurement". John Wiley & Sons Inc., New York, 1989.
- [95] CHEN, C.W. et al. "Visual Information Representation, Communication, and Image Processing". Marcel Dekker Publisher, USA, 1999.
- [96] PARELLI. R.J. "Principles of Fluoroscopic Image Intensification and Television System". CRC Press Publisher, USA, 1996.
- [97] MUDRY, K.M. et al. "Biomedical Imaging". CRC Press Publisher, USA, 2003.
- [98] BRAY, D.E.. "Nondestructive Evaluation". CRC Press Publisher, USA, 1996.
- [99] EOM, E. et al. "Geometric Tomography". Cambridge University Press Publisher, USA, 1995.
- [100] FERREIRA, R. et al. "A beam hardening correction for x-ray microtomography". *NDT&E International*. 31(1), 17-22, 1998.
- [101] BUSHBERG, J.T. et al. "The Essential Physics of Medical Imaging". Lippincott Williams & Wilkins Publisher, USA, 2002.
- [102] RADON et al. "On the functions from their integrals along certain manifolds." *Ber. Searchs. Akad. Wies. Liepzing, Math. Phys. Klars.*, 69, 262-277, 1971.
- [103] HERMAN G. T., "Image reconstruction from projections", *Real-time Imaging*. 1, 3-18, 1995.
- [104] KUDO H, et al. "Cone-beam filtered-backprojection algorithm for truncated helical data". *Physics in Medicine and Biology*. 43, 2885-2909, 1998.
- [105] FELDKAMP L. A. et al. "Practical cone beam algorithm", *Journal of Optical Society of America*. 1(6), 612-619, 1984.

- [106] UMBAUGH, S.E.. "Computed Imaging". CRC Press Publisher, USA, 2005.
- [107] FLYNN, M.J. et al. "Microfocus X-ray sources for 3D microtomography". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A*. 353, 312-315, 1994.
- [108] BUYNAY, C.F. et al. "Applied X-ray computed tomography". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B*. 99, 772-774, 1995.
- [109] LOPES R.T. et al. "Evaluation of a microtomography system with an x-ray microfocus tube." *Applied Radiation and Isotopes*. 48 (10-12), 1437-1442, 1997.
- [110] ISO. "Radiations Methods-Computed Tomography- Guide for Computed Tomography Imaging (ISO/WD 15708-1)". International Standard, 1997.
- [111] BALL, J. "Chesneys' Radiographic Imaging". Blackwell Publishing Publisher, USA, 1995.
- [112] UNDERWOOD *et al.*. "Quantitative Stereology". Assison-Wesley Publishing Company, USA, 1970.
- [113] RECKER *et al.*. "Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation". CRC Press, USA, 1990.
- [114] PARFITT *et al.*. "Bone Histomorphometry: Standardization of nomenclature, Symbols, and Unit." *Journal of Bone and Mineral Research*. 2(6): 595-610, 1987.
- [115] LIMA, I.C.B. "Quantificação Histomorfométrica a partir de Tomografia Computadorizada 3D". Tese de Mestrado, COPPE, RJ, 2002.
- [116] FELDKAMP *et al.*. "The direct Examination of 3-D Bone Architecture In Vivo by Computed Tomography." *Journal of Bone and Mineral Research*. 4(1): 3-11, 1989.
- [117] MULLER R. *et al.*. "Morphometric analysis of human Bone biopsies: A Quantitative Structural Comparison of Histological Sections and Micro-Computed Tomography." *Bone*, 23 (01): 59-66, 1998.
- [118] KINNEY J. et al. "In Vivo, 3-D Microscopy of Trabecular Bone." *Journal of Bone Mineral Research*, 10 (02): 264-270, 1995.
- [119] KINNEY J. et al. "Relationship between plain radiographic patterns and 3-D trabecular architecture in the human calcaneus." *Osteoporosis International*, 9: 339-345, 1999.
- [120] WHITEHOUSE W. *et al.*. "The quantitative morphology of anisotropic trabecular bone." *Journal of Microscopy*, 101 (02): 153-168, 1974.

- [121] R.V. Van Grieken *et al* Handbook of Spectrometry. Marcel Decker Publisher, 2001.
- [122] COMPTON, A. *et al*. "X-rays in theory and experiment". D. Van Nostrand Company, Inc., New York, 1935.
- [123] POLLARD, A. M. *et al*. "Archaeological Chemistry". Royal Society of Chemistry Publisher, USA, 1996.
- [124] SHIRAIWA, T. *et al*. "Theoretical Calculation of Fluorescent X-Ray Intensities in Fluorescent X-Ray Spectrochemical Analysis". *Jpn. J. Appl. Phys.* 10, 886-899, 1966.
- [125] PANTERBURG, F.J. *et al*. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* Section B. 68, 125 (1992).
- [126] DE BOER, D.K.G. "Calculation on x-ray fluorescence intensities from bulk and multilayer samples". *X-ray Spectrometry*. 19, 145-154, 1990.
- [127] SIMABUCO, S.M. "Emprego da Fluorescência de raios x por dispersão em energia no estudo da dinâmica da vizinhança no solo". Tese de D. Sc., IPEN/USP, São Paulo, SP, Brasil, 1993.
- [128] LEROUX, J.E. *et al*. "X-ray Quantitative analysis by air emission-transmission method". *Analytical chemistry*. 38(1), 76-82, 1966.
- [129] NIELSON, K.K. "Matrix Corrections for energy dispersive x-ray fluorescence analysis of environmental samples with coherent/incoherent Scattered x-rays". *Analytical chemistry*. 49(4), 1977.
- [130] HALLAK, A.B. *et al*. "A new method for matrix corrections by isotope excited x-ray fluorescence". *X-ray Spectrometry*. 12(4), 148-149, 1983.
- [131] ANJOS, M.J. "Análise de solos agrícolas por fluorescência de raios X por dispersão em energia". Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2000.
- [132] CURRIE, L.A. "Limits for quantitative detection and quantitative determination". *Analytical Chemistry*. 40(3), 586-593, 1968.
- [133] SPIEGEL, M.R. "Probabilidade e Estatística". Col. Schaum, 2ª. Edição, Bookman, São Paulo, 2004.
- [134] KUMP, P. "Some considerations on the determination of the limit of detection in x-ray fluorescence spectrometry". *Spectrochimica Acta Part B*. 52, 405-408, 1997.

- [135] MORAES, L. M. B. “Utilização de duas variantes da fluorescência de raios X (EDXRF e TXRF) na determinação de chumbo em águas e sedimentos”. Tese de mestrado, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, São Paulo, 2004.
- [136] ALFASSI, Z.B. “Non-Destructive Elemental Analysis”. Publisher Blackwell Publishing, London, 2001.
- [137] ROHLSBERGER, R.. “Nuclear Condensed Matter Physics with Synchrotron Radiation”. Springer Publisher, Alemanha, 2005.
- [138] STRELI, C. “X-ray analysis with synchrotron radiation”, version 1.1, Atomminstitut der Osterreichischen Universitaten, Vorlesungsskriptum, Germany, 1996.
- [139] BERNASCONI, G.A. “Axil: Analysis of x-ray spectra by iterative least squares fitting”. *IAEA Laboratories Seibesdof*, Austin, 1995.
- [140] Canalis E *et al.* “The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in citro”. *Bone* 18, 517-523, 1996.
- [141] Likins R C *et al.* “Comparative metabolism of calcium and strontium in the rat”. *Arch. Biomech Biophys* 83, 472-481, 1959.
- [142] S. G. Dahl *et al.* “Incorporation and Distribution of Strontium in bone”. *Bone*, 28-4, 446-453,2001.
- [143] Parfit A M *et al.* “Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences”. *Calcified Tissue International* 36 (Suppl.), 123-128, 1984.
- [144] OBER, W.C. *et al.* “Fisiologia Humana – Uma abordagem Integrada”. Editora Manole, São Paulo, 2003.
- [145] KRANE, S.M. *et al.* “Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders”. W.B. Saunders Company, USA, 1990.
- [146] FAVUS, M.J. “Primer on the Metabolic Bone diseases and Disorders of Mineral Metabolism”. Lippincott Williams & Wilkins Publisher, USA, 1999.

ANEXO

A. O OSSO

O corpo humano consiste de vários níveis de organização estrutural (químico, celular, tecidual, orgânico, sistêmico e de organismo) que estão associados entre si. Nesse capítulo será mostrada uma breve explanação sobre os aspectos gerais do tipo de tecido a que esse trabalho se dedicou: o tecido conjuntivo ósseo.

A.1. O Tecido Conjuntivo.

Designa-se tecido um conjunto de células que permanecem juntas por meio de conexões especializadas denominadas junções celulares, e de outras estruturas de sustentação. Os tecidos, de uma forma geral, são descritos a partir de suas características físicas:

- (a) a forma e o tamanho das células;
- (b) como as células estão arranjadas nos tecidos (em camadas, dispersas e assim por diante);
- (c) como as células se conectam umas às outras;
- (d) a quantidade de material extracelular que está presente no tecido.

Existem quatro tipos de tecido: epitelial, conjuntivo, muscular e neural, dentre os quais será destacado o segundo.

O tecido conjuntivo é considerado o segundo maior tipo de tecido e se caracteriza pela grande presença de matriz extracelular (material extracelular sintetizado e secretado pelas células de um tecido). A figura A.1 [144] ilustra os componentes desse tipo de tecido. Esse esquema, resumidamente, pode ser explicado da seguinte forma: o tecido conjuntivo é composto por células e pela matriz. As células podem ser móveis (responsáveis principalmente pela defesa do corpo) ou fixas (responsáveis pela manutenção local, reparo do tecido e armazenamento de energia). Quatro tipos de fibras protéicas podem ser encontradas na matriz (colágeno, elastina, fibrilina e fibronectina).

Os tipos de tecido conjuntivo: tecido conjuntivo frouxo, tecido conjuntivo denso e irregular, tecido adiposo, tecido sanguíneo, tecido cartilaginoso e tecido ósseo. A matriz fibrosa dos ossos contém depósitos de minerais, principalmente de sais de cálcio. Esses minerais dão ao osso força e rigidez.

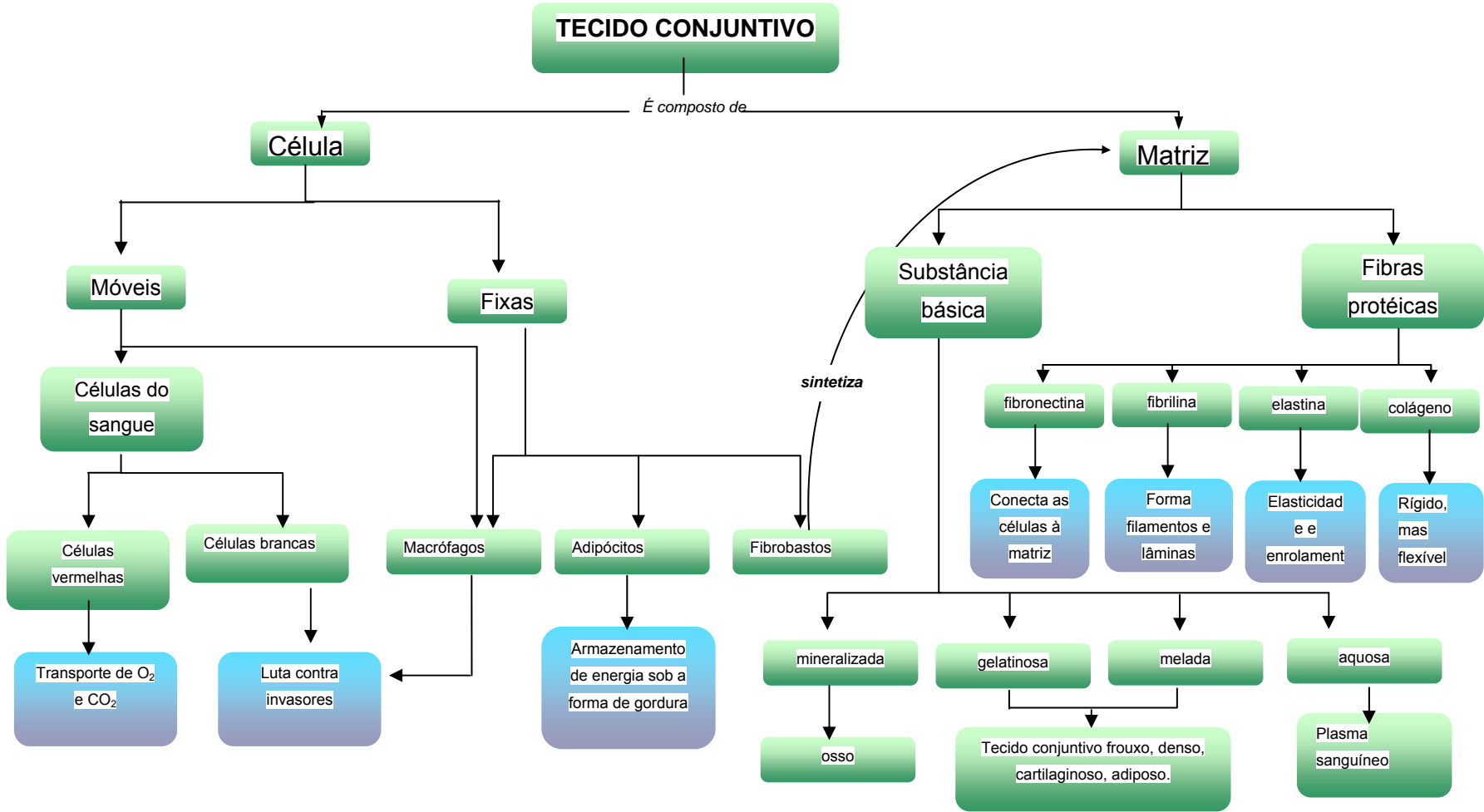


FIGURA A.1 – COMPONENTES DO TECIDO CONJUNTIVO.

A.2. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é formado por células (osteócitos, osteoblastos, osteoclastos) e pela matriz óssea. Suas funções principais estão relacionadas à proteção e sustentação, como pode se visualizado na tabela A.1.

TABELA A.1 – ALGUMAS FUNÇÕES DO OSSO

<i>Função</i>	<i>Descrição</i>
Movimento	Manter ou mudar as posições de partes do corpo pela atuação dos músculos do esqueleto
Proteção	Fechamento e proteção de crânio, pernas e outras partes do corpo.
Suporte	Suporte do corpo e proteção muscular
Depósito de minerais	Serve como depósito de armazenamento de minerais e íons e ajuda indiretamente a manter os fluidos sanguíneos
Formação de células do sangue	Serve como um sítio de produção de células vermelhas e outras do sangue.

Os osteócitos estão localizados em cavidades da matriz óssea, e dentro dessas lacunas formam-se canálculos que se dirigem para outras lacunas, tornando possível a difusão de nutrientes e a conseqüente comunicação entre os osteócitos. Esse tipo de célula é de fundamental importância na manutenção da integridade da matriz óssea.

Os osteoblastos produzem colágeno, enzimas e outras substâncias proteínicas que constituem a porção orgânica da matriz óssea. Possuem sistema de comunicação intercelular semelhante aos osteócitos e esses, inclusive, originam-se de osteoblastos, quando estes são envolvidos completamente por matriz óssea. Localizam-se na superfície óssea.

Os osteoclastos são células multinucleadas, extensamente ramificadas, derivados de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. Participam

O Osso

dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. Secretam vários ácidos e enzimas, que atacam a matriz e liberam cálcio.

De uma forma geral, pode-se dizer que a matriz óssea é composta por uma parte orgânica e outra inorgânica. A primeira é formada por citrato, Mg, K, Na e principalmente de cristais de hidroxiapatita ao longo das fibras colágenas. Esses cristais possuem uma capa de hidratação ao seu redor, formados por íons hidratados. O osso tem uma matriz extracelular calcificada formada quando cristais de fosfatos de cálcio precipitam e se ligam a um suporte de colágeno e a nutrição das células se localiza dentro da matriz óssea. A forma mais comum de fosfato de cálcio é a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). A parte orgânica é composta de 95% de colágeno e o restante é substância fundamental amorfa.

A.3. Classificação e Formação Óssea.

Os ossos são classificados de acordo com a sua forma em longos (podem ser encontrados nos braços e nas pernas), curtos (têm as extremidades praticamente equivalentes e são encontrados nas mãos e nos pés, tendo como exemplo o calcâneo), planos ou chatos (ossos do crânio e bacia).

O osso pode ser encontrado em duas variantes: o compacto e o esponjoso (figura A.2). Essas variedades apresentam o mesmo tipo de célula e de substância intercelular, diferindo entre si apenas na disposição de seus elementos e na quantidade de espaços medulares. O osso trabecular está presente principalmente nas vértebras, crânio, pélvis e porção ultradistal do rádio; já o osso cortical predomina nos ossos longos, colo femoral e rádio distal.

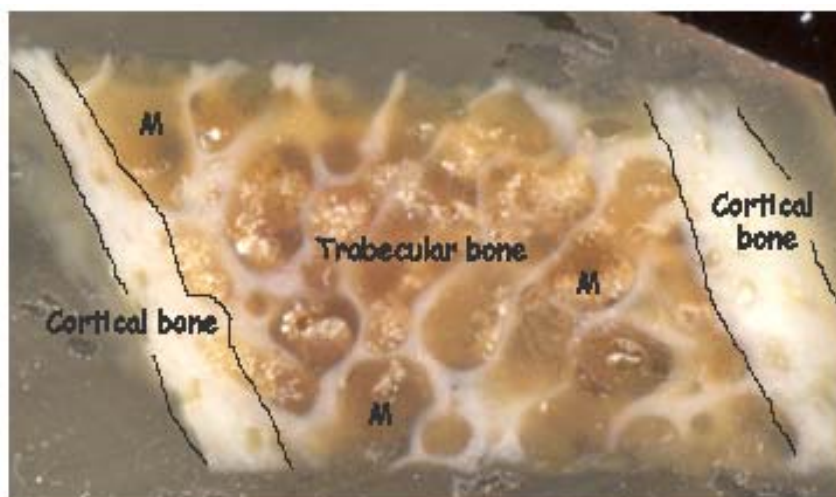


FIGURA A.2 – VARIANTES DO OSSO: CORTICAL E TRABÉCULA.

Na figura A.3 pode-se visualizar a composição dessas duas variantes no esqueleto humano [145].

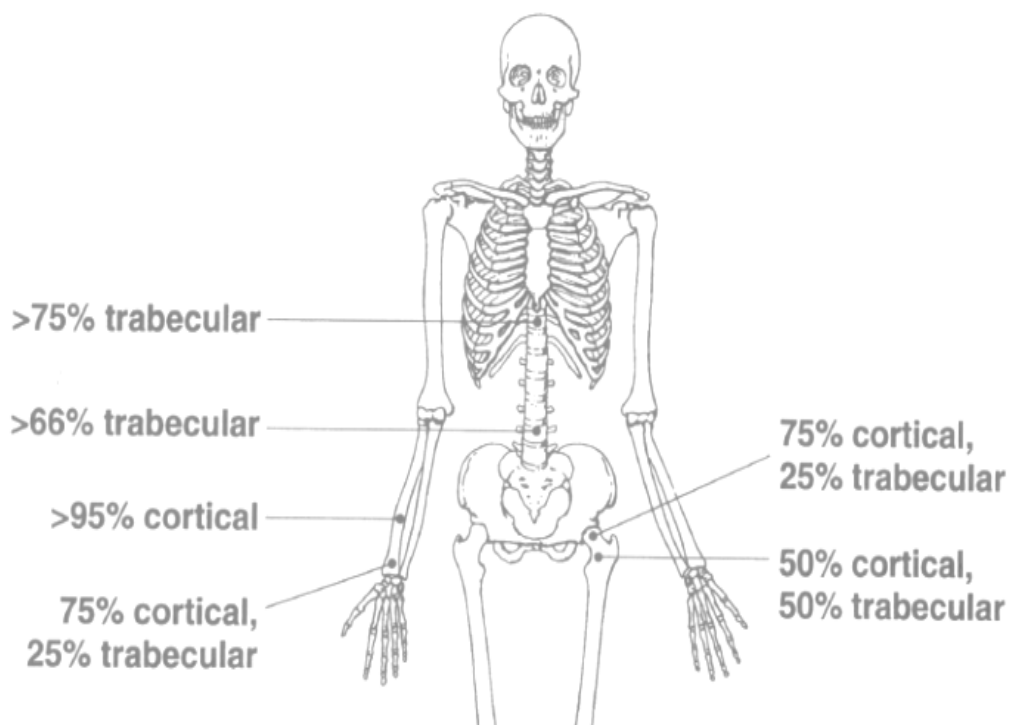


FIGURA A.3 – COMPOSIÇÃO TRABECULAR E CORTICAL NO ESQUELETO HUMANO.

O Osso

O tecido ósseo esponjoso apresenta espaços medulares mais amplos, sendo formado por várias trabéculas, que dão aspecto poroso ao tecido. O tecido ósseo compacto praticamente não apresenta espaços medulares, existindo, no entanto, além dos canalículos, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos: canais de Volkmann e canais de Havers. Por ser uma estrutura inervada e irrigada, os ossos apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração. Os canais de Volkmann partem da superfície do osso (interna ou externa), possuindo uma trajetória perpendicular em relação ao eixo maior do osso. Esses canais se comunicam com os canais de Havers, que percorrem o osso longitudinalmente podendo comunicar-se por projeções laterais. Ao redor de cada canal de Havers, podem-se observar várias lamelas concêntricas de substância intercelular e de células ósseas. Cada conjunto deste, formado pelo canal central de Havers e por lamelas concêntricas é denominado sistema de Havers ou sistema haversiano. Os canais de Volkmann não apresentam lamelas concêntricas.

O fêmur é um tipo de osso longo cujas principais estruturas e componentes podem ser visualizados na figura A.4. O fêmur é o osso mais longo e mais volumoso do corpo humano, e localiza-se na coxa. Também é o osso mais resistente. O fêmur consiste da diáfise, da epífise proximal que se prolonga, através de um pescoço, até uma cabeça (esférica) - que o articula com o osso do quadril - e da epífise distal que se divide em dois côndilos, que se ligam à tibia e à patela.

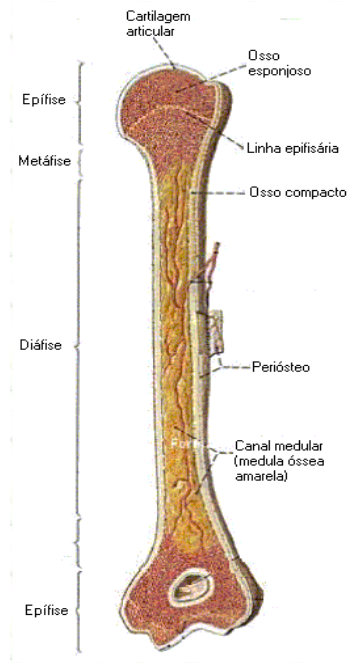


FIGURA A.4 – ESTRUTURAS DO FÊMUR.

Os ossos se formam no embrião de um esboço constituído por tecido cartilaginoso e por tecido membranoso que representam o osso primário e secundário. Com o tempo, tais esboços começam a se ossificar. Por ocasião do nascimento, os ossos estão quase inteiramente no estado cartilaginoso. A ossificação se processa durante toda a infância e adolescência e só está completa depois do 24º ano de idade. Então todo o esqueleto tornou-se ósseo.

Nos ossos longos forma-se um centro de ossificação na diáfise e um em cada epífise; desses três pontos o tecido ósseo começa a estender-se até que o tecido proveniente de um centro se funde com aquele que provém dos outros centros. Nos ossos chatos, o centro de ossificação é na parte mediana e daqui o processo se irradia para a periferia. A ossificação se processa de modo diverso conforme o esboço originário é de natureza cartilaginosa ou membranosa. Nos ossos de origem cartilaginosa, o processo se inicia na membrana que reveste a cartilagem e que se chama pericôndrio. O pericôndrio se transforma pouco a pouco em perióstio, no qual se distinguem células particulares, os osteoblastos, que estão encarregadas de produzir o osso: reveste-os a cartilagem formando um fino estrato ósseo (lâmina fundamental)

O Osso

e, multiplicando-se, dão origem a uma nova substância óssea, a qual se acumula primeiramente de modo irregular e depois em delgadas lâminas ósseas estratificadas de modo bastante regular. Começada assim a ossificação, ela se estende. Do tecido ósseo apenas formado se destacam os osteoblastos que emigram para a cartilagem restante; são eles acompanhados de ramificações de vasos sanguíneos. No território invadido, os osteoblastos retomam a sua função, formam novo tecido ósseo, até que a cartilagem esteja inteiramente transformada em osso. A completa transformação da cartilagem em osso só tem lugar na idade adulta; até os 20 ou 25 anos fica sempre, entre a diáfise e as epífises, uma linha de cartilagem que faz crescer o osso em comprimento. Nos ossos secundários, derivados não de uma cartilagem, mas de um esboço de tecido membranoso, a ossificação tem lugar assim: as células embrionárias se transformam em osteoblastos e estes iniciam a sua proliferação do centro para a periferia, até que se complete a formação do tecido ósseo.

A.4. Remodelação Óssea

O sistema ósseo passa sempre por um processo dinâmico, acontecendo simultaneamente em diversas partes do esqueleto, sendo constantemente formado e degradado, chamado de remodelação óssea [146]. Esse processo ocorre por meio dos processos de reabsorção e formação (que estão intimamente ligados) intermediados pelos osteoclastos e osteoblastos respectivamente (figura A.5). Durante a reabsorção, a estrutura óssea é dissolvida e digerida pelos ácidos e enzimas produzidos pelos osteoclastos. Os produtos resultantes da deterioração de proteína da matriz são liberados em ambiente extracelular e excretados pela urina. A formação óssea, atividade processada pelos osteoblastos, é realizada pela síntese de colágeno e outras proteínas, depositados na matriz e depois mineralizados. Em resumo, pode-se dizer que quando o osso velho é destruído pelos osteoclastos, pequenos buracos se formam e esses são reparados por osteoblastos. Nesse momento, o cálcio e outros minerais são depositados na matriz colágena, aumentando a densidade óssea.

Ciclo de Remodelação Óssea

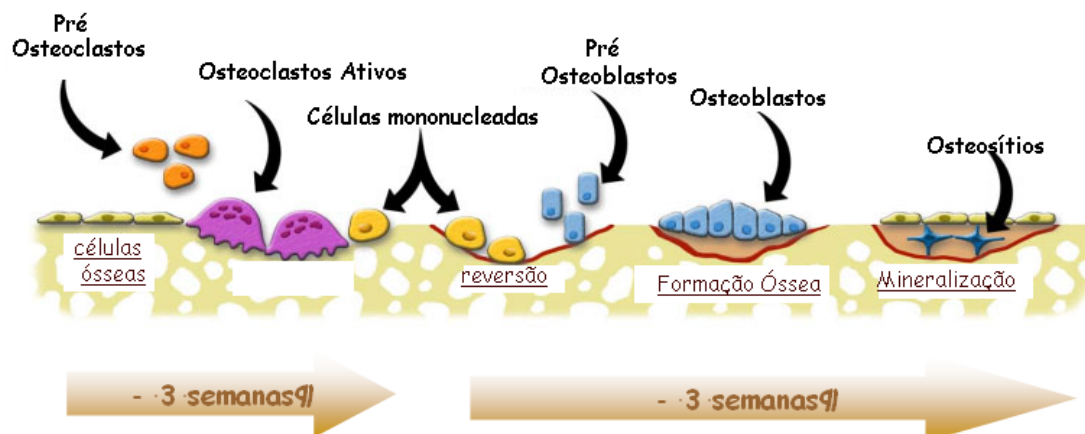


FIGURA A.5 – ESQUEMA DA REMODELAÇÃO ÓSSEA.

Os fatores que interferem na formação óssea podem ser divididos em dois grupos: fatores intrínsecos e fatores extrínsecos. Os primeiros incluem fatores hereditários (responsáveis por cerca de 80% do pico final de massa óssea), raça, sexo e fatores hormonais (hormônio de crescimento, fator de crescimento dependente de insulina I, estrógeno e testosterona); os fatores extrínsecos, por sua vez, dizem respeito a aspectos nutricionais, fatores mecânicos, hábitos, presença de doenças crônicas e uso de medicamentos.

Entre os fatores de risco para um menor pico de massa óssea, incluem-se sexo feminino, raça caucasiana, puberdade tardia, baixa ingestão de nutrientes (cálcio, vitaminas, calorias), tabagismo, consumo excessivo de álcool, peso inadequado para a idade e baixa atividade física. A ocorrência de doenças crônicas e, muitas vezes, a terapêutica utilizada para seu tratamento podem interferir e agravar diversos desses aspectos.

O Osso

A remodelação óssea acontece de forma mais rápida no osso trabecular do que no cortical. Isso porque o osso trabecular apresenta maior metabolismo, sendo, portanto, mais suscetível às alterações da massa óssea.

A.5. O importante papel do Cálcio no Osso.

O cálcio é o mineral mais abundante no osso, e, portanto indispensável para o seu adequado desenvolvimento. A tabela A.2 fornece as funções básicas desse mineral no esqueleto.

TABELA A.2 – FUNÇÕES DO CÁLCIO NO ESQUELETO.

Compartimento	Função	Percentagem do Cálcio total no corpo (%)
Extracelular	Matriz óssea calcificada	99
Fluido extracelular	“Cimento” das junções comunicantes; contração das musculaturas miocárdica e lisa; liberação de neurotransmissores em sinapses; excitabilidade dos neurônios em razão do efeito da permeabilidade ao Na ⁺ ; cofator da cascata de coagulação.	0,1
Intracelular	Vias de sinal em segundo mensageiro; contração muscular.	0,9

Embora 99% de todo o cálcio se encontre nos ossos, uma pequena fração desse mineral não ossificado é o mais crítico para o funcionamento fisiológico do corpo. O cálcio proveniente da dieta está associado com outros compostos, quando este então chega ao estômago devido ao baixo pH da localidade a associação do cálcio com outros compostos se rompe dando origem ao Ca^{2+} dissociado, ou seja, sua forma iônica que será absorvida no intestino.

Existe um enorme gradiente de concentração entre o Ca^{2+} extracelular e o Ca^{2+} da membrana celular. Em razão de o cálcio ser essencial para muitas funções fisiológicas, a concentração plasmática de Ca^{2+} é rigorosamente controlada. Se, por sua vez, essa concentração cair, tem-se a exploração desse íon pertencente ao osso.

O cálcio somente é absorvido quando se encontra em sua forma iônica, permanecendo nesta forma até um pH de 5,5 (porções iniciais do intestino delgado), destes apenas 20% a 40% são absorvidos. Devem-se evitar certas substâncias que, quando associadas ao Ca^{2+} , formam produtos de baixa ionização, dificultando a dissociação e conseqüentemente sua absorção. Deve-se estar presente o PTH (paratormônio) e a vitamina D, obrigatoriamente, para que ocorra a absorção.

O PTH mobiliza cálcio do osso. No tecido ósseo, o PTH atua nos osteoblastos promovendo a síntese e secreção de um ativador local de osteoclastos, aumentando a atividade osteoclástica. Esta ação aumenta a reabsorção óssea. O PTH promove então a liberação de cálcio do osso, além de aumentar a reabsorção e diminuir a excreção renal de cálcio.

A vitamina D tem a função de aumentar as concentrações de cálcio e fósforo no sangue e permitir a mineralização adequada dos ossos, participando da formação do tecido ósseo e assim, regulando a entrada e o depósito de cálcio nos ossos.

A.6. Osteoporose: Uma Doença Associada à Perda Óssea.

A remodelação óssea é diferente em cada fase da vida. No início da vida, a formação óssea é superior à reabsorção, e há aumento no tamanho e na resistência do osso. O inverso ocorre no envelhecimento, onde conforme passam os anos, a reabsorção óssea supera a formação, e podem surgir diversos problemas ósseos tal como a osteoporose.

A osteoporose é definida pela Organização Mundial de Saúde como uma doença metabólica óssea sistêmica, caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade do osso e da suscetibilidade a fraturas. A figura A.6 ilustra a arquitetura de um osso normal e outro osteoporótico.

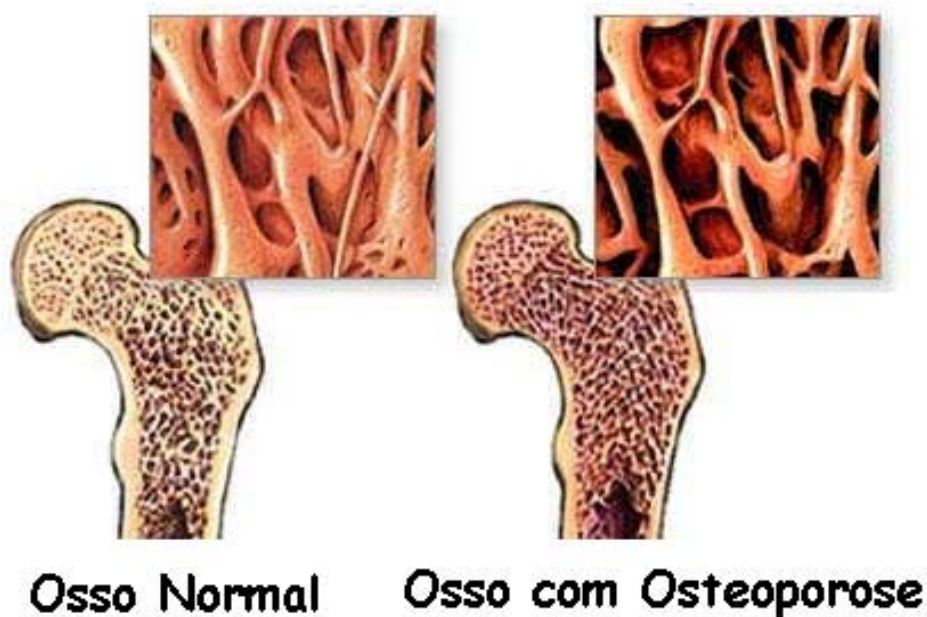


FIGURA A.6 – VISUALIZAÇÕES DE OSSO NORMAL E OSSO COM OSTEOPOROSE

A fratura de fêmur é a consequência mais dramática da osteoporose. De 15% a 20% dos pacientes com fratura de quadril morrem devido à fratura ou suas complicações durante a cirurgia. A fratura de fêmur é a consequência mais dramática da osteoporose.

Em aproximadamente 20% dos casos pode ser identificada uma doença da qual a osteoporose é secundária e nos 80% restantes os pacientes são portadores de osteoporose da pós-menopausa ou osteoporose senil.

Observam-se, portanto, dois padrões distintos de alterações no funcionamento das unidades de remodelamento que levarão à osteoporose. Um é lento e dependente da idade - osteoporose senil - e relacionado com defeito na formação óssea; os osteoclastos produzem lacunas de profundidade normal ou até menores, mas os osteoblastos são incapazes de preenchê-las completamente.

Já as modificações que ocorrem com a queda de estrógenos levam a um remodelamento onde há maior número de osteoclastos e cada um produz uma cavidade mais profunda; também há aumento da atividade dos osteoblastos que tentam corrigir o defeito, mas não conseguem, caracterizando o remodelamento acelerado onde a atividade de reabsorção é maior e, no final de cada ciclo, haverá um declínio significativo de massa óssea - osteoporose da pós-menopausa.

Fator de Risco é qualquer situação que aumenta a chance de um determinado efeito acontecer. Falando em fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose estão relacionados com o aumento da chance de desenvolvê-la. Os principais fatores de risco são:

- sexo feminino;
- menopausa precoce;
- idade avançada;
- raça branca e amarela;
- estrutura óssea pequena e baixo peso;

- familiar com osteoporose;
- familiar com osteoporose e história de fratura;
- tabagismo;
- sedentarismo e condições que levem a imobilização;
- alcoolismo;
- uso de bebidas contendo cafeína;
- baixa exposição solar;
- dieta pobre em cálcio;
- uso de medicamentos como, por exemplo: corticoesteróides, heparina, anticoagulantes e anticonvulsivantes;
- doenças como insuficiência renal, hipertireoidismo, mieloma múltiplo entre outros.