



MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E MICROFLUORESCÊNCIA DE
RAIOS X POR LUZ SÍNCROTRON PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA
RADIAÇÃO EM MICROESTRUTURAS ÓSSEAS DE RATOS

Liebert Parreiras Nogueira

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

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cély Barroso

Rio de Janeiro
Dezembro de 2011

MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E MICROFLUORESCÊNCIA DE
RAIOS X POR LUZ SÍNCROTRON PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA
RADIAÇÃO EM MICROESTRUTURAS ÓSSEAS DE RATOS

Liebert Parreiras Nogueira

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

Examinada por:

Prof. Delson Braz, D.Sc.

Prof. Regina Cély Rodrigues Barroso, D.Sc.

Prof. Ademir Xavier da Silva, D.Sc.

Prof. Silvana Moreira, D.Sc.

Prof. Simone Coutinho Cardoso, D.Sc.

Prof. Carlos Eduardo Veloso de Almeida, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

DEZEMBRO DE 2011

Nogueira, Liebert Parreiras

Microtomografia computadorizada e microfluorescência de raios X por luz síncrotron para avaliação dos efeitos da radiação em microestruturas ósseas de ratos / Liebert Parreiras Nogueira – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XIV, 136p.: il.; 29,7 cm.

Orientador(es): Delson Braz

Regina Cély Barroso

Tese (doutorado) – UFRJ / COPPE / Programa de Engenharia Nuclear, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 83-91

1. Tomografia computadorizada. 2. Histomorfometria óssea. 3. Luz Síncrotron. 4. Microfluorescência de raios X. I. Braz, Delson *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título

*Quanto melhor é adquirir a
sabedoria do que o ouro! E quanto
mais excelente, adquirir a
prudência do que a prata
(Pv. 16; 16)*

Aos meus pais, José Roberto e Izete.

À minha esposa Ingrid Vasconcelos, pelo grande apoio e compreensão durante meus estudos.

Aos meus irmãos Maic, Keila, Letícia e Roberta

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo.

Gostaria de agradecer à Professora Regina Cély, pela orientação neste trabalho, pela paciência e atenção, carinho e incentivo a mim prestados durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Professor Delson Braz pela orientação e por acreditar em mim.

Ao Professor Carlos Eduardo pelo suporte prestado pelo Laboratório de Ciências Radiológicas da UERJ.

Ao André Almeida, pela ajuda nas análises de μ XRF.

À Cherley e à Camila, pela ajuda com os animais e nas medidas no LNLS.

A todos os integrantes do Laboratório de Física Médica da UERJ.

Aos amigos, que sempre estiveram presentes, apoiando e ajudando.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS.

Ao Programa de Usuários ICTP/ELETTRA pelo apoio financeiro recebido para realização das medidas no ELETTRA Synchrotron Radiation Facility, na Itália. À Dra. Giuliana Tromba, coordenadora da linha SYRMEP.

E, ao CNPq pelo suporte financeiro.

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

MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA E MICROFLUORESCÊNCIA DE
RAIOS X POR LUZ SÍNCROTRON PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA
RADIAÇÃO EM MICROESTRUTURAS ÓSSEAS DE RATOS

Liebert Parreiras Nogueira

Dezembro/2011

Orientadores: Delson Braz

Regina Cély Barroso

Programa: Engenharia Nuclear

Câncer é uma classe de doença cujas células apresentam um crescimento descontrolado, invasão e às vezes metástase. Para o controle e tratamento do câncer, a radioterapia muitas vezes é usada, e é inevitável que tecidos saudáveis sejam afetados pela radiação ionizante utilizada no processo. O objetivo deste trabalho foi analisar possíveis alterações nas microestruturas ósseas devido ao tratamento radioterápico no câncer de mama, quando os ossos das costelas normalmente são irradiados por estarem dentro do campo de irradiação. Ratos Wistar foram irradiados com feixes de fótons e elétrons com energias e doses compatíveis às utilizadas em tratamentos radioterápicos de câncer de mama. Os ratos foram sacrificados em diferentes períodos. Os ossos das costelas foram analisados através da técnica de histomorfometria por microtomografia computadorizada com luz síncrotron e também por microfluorescência de raios X (μ XRF). Os índices analisados em histomorfometria foram BV/TV (razão volume ósseo-volume total), BS/BV (razão superfície óssea-volume ósseo), Tb.N (densidade trabecular), Tb.Th (espessura trabecular) e Tb.Sp (espaçamento trabecular). Em μ XRF foram analisados os mapas de intensidades dos principais elementos que compõem o osso. Os resultados de microtomografia mostraram alterações significativas em alguns parâmetros histomorfométricos, e os mapas de μ XRF não revelaram alterações nas distribuições elementares em função da irradiação.

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

SYNCHROTRON LIGHT COMPUTED MICROTOMOGRAPHY AND X-RAY
MICROFLUORESCENCE FOR EVALUATION OF RADIATION EFFECTS ON
BONE MICROSTRUCTURE OF RATS

Liebert Parreiras Nogueira

December/2011

Advisors: Delson Braz

Regina Cély Barroso

Department: Nuclear Engineering

Cancer is a class of disease in which the cells presents uncontrolled growth, invasion and sometimes metastasis. So that cancer can be controlled e treated, radiotherapy is often used, and it is unavoidable that healthy tissues are not affected by the ionizing radiation used in the process. The objective of this work was to analyze possible alterations on bone microstructures due to breast cancer radiotherapy treatment in which the bones of the rib are usually irradiated, as they are inside the field of irradiation. Wistar rats were irradiated with photon and electron beams with energies and doses which are compatible to those used in radiotherapy treatment for breast cancer. The rats were sacrificed in different times after the irradiation. Ribs were analyzed using the histomorphometry technique by synchrotron radiation computed microtomography and also by x-ray microfluorescence (μ XRF). The analyzed indices in histomorphometry were: BV/TV (bone volume fraction), BS/BV (bone surface-volume ratio), Tb.N (trabecular number), Tb.Th (trabecular thickness) and Tb.Sp (trabecular separation). In μ XRF the intensity distribution maps of the main elements that comprise bones were analyzed. Microtomography results showed significant alterations in some histomorphometric parameters, and μ XRF maps did not reveal any alteration on elemental distribution due to irradiation.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
I INTRODUÇÃO.....	1
I.1 <i>Objetivos</i>	6
I.2 <i>Justificativa</i>	6
CAPÍTULO II.....	8
II FUNDAMENTOS TEÓRICOS	8
II.1 <i>A Tomografia Computadorizada</i>	8
II.2 <i>A Reconstrução de Imagens Tomográficas</i>	9
II.2.1 Teorema da Fatia de Fourier	12
II.2.2 Reconstrução por Retroprojeção 2D.....	14
II.3 <i>Quantificação dos Dados Tomográficos</i>	17
II.3.1 Quantificação Histomorfométrica Através da Tomografia Computadorizada 3D (TC-3D).....	18
II.4 <i>Fluorescência de Raios X</i>	22
II.4.1 Microfluorescência de raios X.....	24
II.4 <i>Radiação Síncrotron</i>	26
II.4.1 Características Gerais	26
II.4.2 Produção da Luz Síncrotron.....	27
II.5 <i>Tecido Ósseo</i>	31
II.5.1 Tecido Ósseo Esponjoso	32
II.5.2 Tecido Ósseo Compacto	32
II.5.3 Composição do Tecido Ósseo.....	33
II.5.4 A remodelação óssea	34
II.6 <i>Radioterapia</i>	35
II.6.1 Teleterapia e Braquiterapia	36
II.6.2 Aceleradores lineares	36
CAPÍTULO III	38
III MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
III.1 <i>Animais utilizados</i>	38
III.2 <i>Irradiação e preparação das amostras</i>	38
III.3 <i>Microtomografias</i>	41
III.3.1 SYRMEP	41
III.3.2 Seleção dos Parâmetros da Linha de Luz.....	45
III.3.3 Aquisição das Tomografias	48
III.3.4 Reconstrução das Imagens	51
III.3.5 Quantificação das Amostras de Osso	53

III.4	<i>Microfluorescência de raios X (μXRF)</i>	54
III.4.1	Linha de luz síncrotron.....	54
CAPÍTULO IV	58
IV	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
IV.1	<i>Fótons x Elétrons x Controle (μTC) – 1º sacrifício</i>	61
IV.1.1	Imagens	61
IV.1.2	Quantificação histomorfométrica.....	63
IV.2	<i>Fótons x Controle (μTC) – 2º sacrifício</i>	71
IV.2.1	Imagens	71
IV.2.2	Quantificação histomorfométrica.....	72
IV.3	<i>Fótons x Controle (μXRF) – 2º sacrifício</i>	77
CAPÍTULO V	81
V	CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO A	92
A.1	Imagens de microtomografia computadorizada (μ TC)	93
A.2	Imagens de microfluorescência de raios X (μ XRF).....	97
ANEXO B	105

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura II.1 – Princípio de aquisição de uma tomografia (BRAZ, 1997).</i>	9
<i>Figura II.2 – Representação esquemática dos raio- soma (BARROSO, 1997)</i>	11
<i>Figura II.3 – Filtros utilizados na reconstrução (OLIVEIRA, 2002)</i>	17
<i>Figura II.4 – Imagem de tomografia de osso de 8-bits. (NOGUEIRA, 2008)</i>	20
<i>Figura II.5 – Histograma de uma imagem tomográfica 2D de 8-bit.</i>	21
<i>Figura II.6 – Imagem de tomografia de osso binarizada</i>	22
<i>Figura II.7 – Esquema experimental para mapeamento por μXRF</i>	25
<i>Figura II.8 – Composição do osso (Adaptado de Netter, 2004).</i>	32
<i>Figura II.9 – Remodelamento ósseo</i>	35
<i>Figura III.1 – Processo de anestesia da cobaia antes da irradiação</i>	39
<i>Figura III.2 – Ratos imobilizados no suporte de isopor</i>	39
<i>Figura III.3 – Costela do rato após limpeza</i>	40
<i>Figura III.4 – Esquema das costelas dos ratos</i>	41
<i>Figura III.5 – Lâminas de costelas (a) dorsal e (b) ventral</i>	41
<i>Figura III.6 – Esquema funcional da linha SYRMEP.</i>	42
<i>Figura III.7 – Câmara de ionização</i>	43
<i>Figura III.8 – Suporte rotacional.</i>	44
<i>Figura III.9 – Câmera CCD 16-bits utilizada na aquisição das imagens.</i>	44
<i>Figura III.10 – Set-up experimental usado para obtenção de imagens por transmissão e contraste de fase na linha do SYRMEP.</i>	45
<i>Figura III.11 – (a) Interface do sistema de controla da linha mini-BCS; (b) Submenu para cálculo automático da energia do feixe</i>	46
<i>Figura III.12 – Monitor indicando o fluxo do feixe de raios X lido pela câmara de ionização</i>	47
<i>Figura III.13 – Câmera CCD posicionada no trilho para seleção da distância amostra-detector</i>	47
<i>Figura III.14 –Interface do programa Newport para o alinhamento do centro da amostra e do detector</i>	48
<i>Figura III.15 – Interface do programa Image Pro Plus: (a) Submenu para seleção da área de captura da imagem. (b) Submenu para seleção do tempo de aquisição e binning da imagem.</i>	49

<i>Figura III.16 – (a) Submenu para seleção do número de imagens a serem adquiridas.</i>	
<i>(b) Submenu para seleção do passo angular e destinação dos arquivos gerados.</i>	49
<i>Figura III.17 – (a) Imagem da amostra. (b) Imagem flat. (c) Imagem dark (NOGUEIRA, 2008).</i>	50
<i>Figura III.18 – (a) Janela do programa de reconstrução mostrando um exemplo de projeção e a escolha do slice na imagem. (b) Sinograma do slice escolhido definindo os limites esquerdo e direito (setas vermelhas) e o filtro usado (pela seta branca). (c) Janela para a reconstrução do volume (seta branca) e a conversão das imagens para 8-bit (seta vermelha).</i>	52
<i>Figura III.19 – Processo de binarização da imagem de uma amostra usando o programa ImageJ[®].</i>	53
<i>Figura III.20 – Setup da linha de microfluorescência</i>	56
<i>Figura IV.1 – Slices de diferentes profundidades da região de conexão entre as partes dorsal e ventral.</i>	59
<i>Figura IV.2 – Regiões analisadas das costelas</i>	59
<i>Figura IV.3 – Imagens 3D de diferentes ângulos da costela</i>	60
<i>Figura IV.4 – Imagens 3D com threshold de (a) 50; (b) 85 e (c) 120.</i>	61
<i>Figura IV.5 – Imagens 3D e 2D de costelas dorsais dos grupos (a) Contr-1, (b) Fot-1 e (c) Elet-1</i>	62
<i>Figura IV.6 – Imagens 3D e 2D de costelas ventrais dos grupos (a) Contr-1, (b) Fot-1 e (c) Elet-1</i>	62
<i>Figura IV.7 – Gráfico de BV/TV referente ao 1º sacrifício</i>	64
<i>Figura IV.8 – Gráfico de BS/BV referente ao 1º sacrifício</i>	65
<i>Figura IV.9 – Gráfico de Tb.Th referente ao 1º sacrifício</i>	66
<i>Figura IV.10 – Gráfico de Tb.N referente ao 1º sacrifício</i>	67
<i>Figura IV.11 – Gráfico de Tb.Sp referente ao 1º sacrifício</i>	68
<i>Figura IV.12 – Seção transversal de amostras de controle</i>	69
<i>Figura IV.13 – Seção transversal de amostras irradiadas com elétrons</i>	69
<i>Figura IV.14 – Seção transversal de amostras irradiadas com fótons</i>	69
<i>Figura IV.15 – Reconstrução 3D de amostras de controle</i>	70
<i>Figura IV.16 – Reconstrução 3D de amostras irradiadas com elétrons</i>	70
<i>Figura IV.17 – Reconstrução 3D de amostras irradiadas com fótons</i>	70
<i>Figura IV.18 – Tendência de aumento da porosidade de um dos lados de uma amostra irradiada com fótons.</i>	71

<i>Figura IV.19 – Imagens 3D e 2D de costelas dorsais dos grupos (a) Contr-2 e (b) Fot-2</i>	72
<i>Figura IV.20 – Imagens 3D e 2D de costelas ventrais dos grupos (a) Contr-2 e (b) Fot-2</i>	72
<i>Figura IV.21 – Gráfico de BV/TV referente ao 2º sacrifício</i>	73
<i>Figura IV.22 – Gráfico de BS/BV referente ao 2º sacrifício</i>	74
<i>Figura IV.23 – Gráfico de Tb.Th referente ao 2º sacrifício</i>	75
<i>Figura IV.24 – Gráfico de Tb.N referente ao 2º sacrifício</i>	75
<i>Figura IV.25 – Gráfico de Tb.Sp referente ao 2º sacrifício</i>	76
<i>Figura IV.26 – (a) fatia de uma amostra de controle usada na μXRF; (b) distribuição do Ca na amostra; (c) distribuição do ferro na amostra e; (d) mesclagem das distribuições de cálcio e ferro.</i>	78
<i>Figura IV.27 – (a) fatia de uma amostra da região cortical usada na μXRF; (b) distribuição do Sr; (c) distribuição do K; (d) distribuição do Ca; e (e) distribuição do Zn.</i>	79
<i>Figura IV.28 – Distribuição de Zinco para uma amostra cortical de controle</i>	80
<i>Figura A.1 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Contr-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	93
<i>Figura A.2 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Contr-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	93
<i>Figura A.3 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Elet-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	93
<i>Figura A.4 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Elet-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	94
<i>Figura A.5 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Fot-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	94
<i>Figura A.6 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Fot-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	94
<i>Figura A.7 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Contr-2. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	95
<i>Figura A.8 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Contr-2. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	95
<i>Figura A.9 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Fot-2. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	96

<i>Figura A.10 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Fot-2. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.</i>	<i>96</i>
<i>Figura A.11 – Distribuição de Ca nas amostras dorsais de controle (Contr-2).</i>	<i>97</i>
<i>Figura A.12 – Distribuição de Ca nas amostras dorsais irradiadas (Fot-2).</i>	<i>97</i>
<i>Figura A.13 – Distribuição de Ca nas amostras ventrais de controle (Contr-2).</i>	<i>98</i>
<i>Figura A.14 – Distribuição de Ca nas amostras ventrais irradiadas (Fot-2).</i>	<i>98</i>
<i>Figura A.15 – Distribuição de K nas amostras dorsais de controle (Contr-2).</i>	<i>99</i>
<i>Figura A.16 – Distribuição de K nas amostras dorsais irradiadas (Fot-2).</i>	<i>99</i>
<i>Figura A.17 – Distribuição de K nas amostras ventrais de controle (Contr-2).</i>	<i>100</i>
<i>Figura A.18 – Distribuição de K nas amostras ventrais irradiadas (Fot-2).</i>	<i>100</i>
<i>Figura A.19 – Distribuição de Sr nas amostras dorsais de controle (Contr-2).....</i>	<i>101</i>
<i>Figura A.20 – Distribuição de Sr nas amostras dorsais irradiadas (Fot-2).....</i>	<i>101</i>
<i>Figura A.21 – Distribuição de Sr nas amostras ventrais de controle (Contr-2).</i>	<i>102</i>
<i>Figura A.22 – Distribuição de Sr nas amostras ventrais irradiadas (Fot-2).</i>	<i>102</i>
<i>Figura A.23 – Distribuição de Zn nas amostras dorsais de controle (Contr-2).....</i>	<i>103</i>
<i>Figura A.24 – Distribuição de Zn nas amostras dorsais irradiadas (Fot-2).....</i>	<i>103</i>
<i>Figura A.25 – Distribuição de Zn nas amostras ventrais de controle (Contr-2).....</i>	<i>104</i>
<i>Figura A.26 – Distribuição de Zn nas amostras ventrais irradiadas (Fot-2).....</i>	<i>104</i>

CAPÍTULO I

I INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (câncer maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. O câncer é a segunda causa de óbito, seguido apenas pelas doenças cardíacas, nos Estados Unidos e Canadá.

Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida.

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada. Porém muitos órgãos adjacentes ao tumor acabam sendo irradiados com doses significantes por estarem muito próximos aos chamados órgãos-alvo como, por exemplo, o caso do tratamento radioterápico para câncer de mama em que os ossos da costela que estão no mesmo campo do feixe de radiação acabam recebendo uma dose relativamente alta de radiação.

Os efeitos de altas doses de radiação nos ossos vêm sendo frutos de vários trabalhos, a fim de avaliar tanto os efeitos da radiação na densidade óssea quanto na sua microestrutura. A avaliação da microestrutura óssea fornece dados importantes capazes de definir se um indivíduo desenvolveu algum tipo de doença óssea.

ARNOLD *et al* (1998) investigaram os efeitos de irradiações de dose única na recuperação de ossos, em diferentes momentos antes e depois de um trauma cirúrgico em ratos fêmeas. O efeito de irradiações pré e pós-operatórias em dose única de raios X na cicatrização óssea de um buraco de 1,2 mm de espessura feito por uma broca no fêmur do rato foi medido 6 e 7 semanas após a cirurgia em secções histológicas usando

métodos morfométricos. Os resultados mostraram que a irradiação dada entre 1 dia e 6 meses antes da cirurgia e até 3 dias após, resultaram numa redução da cicatrização óssea.

Outros trabalhos remetem ao estudo do comportamento das estruturas ósseas em consequência de doses de radiação recebidas devido a algum tipo de tratamento radioterápico (HOPEWELL, 2003; HAMILTON *et al.*, 2006). Estas consequências podem ser o risco de fraturas ósseas (GUO & KIM, 2002; BAXTER *et al.*, 2005), osteorradionecrose (DONAVAN *et al.*, 2005), retardo no crescimento ósseo de crianças (EIFEL *et al.*, 1995), dentre outros.

Fraturas ósseas foram documentadas em pacientes que foram acompanhados após tratamento de câncer de mama e foram submetidos a seções de radioterapia. A taxa de fratura encontrada variou entre 1,8% (PIERCE *et al.*, 1992) e 19% (OVERGAARD *et al.*, 1988), onde os fatores que contribuíram para esta variação incluem a dose total, dose por fração, energia do fóton, e tempo após a exposição.

As mudanças patológicas observadas após radioterapias são inespecíficas, mas incluem uma combinação de diminuição da densidade trabecular, fibrose de medula óssea, microfraturas trabeculares e necrose focal (MASSIN & DUPARC, 1995). Embora acreditem-se que muitas destas são consequências de mudanças vasculares, dados sugerem que há também alterações de manifestação de citocina que podem causar alterações na proliferação de osteoblastos e na diferenciação da formação da matriz extracelular (DUDZIAK *et al.*, 2000). Além disso, estas alterações no micro-ambiente do osso normal resultam no fluxo sanguíneo diminuído, na atrofia óssea (medida pela diminuição no peso seco do osso), e na diminuição em quantidades relativas de cálcio e fósforo, que é sugestiva da perda mineral óssea (HOPEWELL, 2003).

Efeitos de radiações em ossos ocorrem quando as doses excedem 4000 cGy. Sabem-se bem que os danos ósseos oriundos de radiações terapêuticas são maiores em pacientes tratados por irradiações de curta duração. Nestes tipos de tratamentos, os pacientes recebem altas doses de radiação por fração. Dois estudos de acompanhamentos de longa duração usando este protocolo de radiação para câncer retal operável demonstraram um aumento de duas vezes no risco de fratura de quadril (HOLM, *et al.*, 1996)

A degradação óssea está relacionada à diminuição das trabéculas no interior os ossos e à perda de osso cortical, levando à doença conhecida como osteoporose. A osteoporose é uma doença sistêmica caracterizada pela baixa massa óssea e alterações microestruturais do tecido ósseo resultando na estabilidade reduzida e em um elevado risco de fraturas. (THURNER *et al.*, 2006).

CHEN *et al.* (2002) mostraram em seu trabalho que o índice utilizado como padrão para determinação de osteoporose, a densidade mineral óssea (do inglês BMD – Bone Mineral Density), não foi um bom indicador de alterações pós-irradiação. Os valores de BMD não se alteraram em pacientes acompanhados por até sete anos após tratamento radioterápico, o que sugere que as características estruturais são de primordial importância na determinação de possíveis fraturas ósseas, já que outros estudos mostram que doenças ósseas como fratura, osteosclerose e osteonecrose são comumente observadas após radioterapia (GILSANZ *et al.*, 1990, NEGLIA *et al.*, 1993).

A radioterapia para câncer de mama pode ser realizada em conjunto com a quimioterapia. Esta associação pode oferecer uma chance maior de cura para o paciente, evitando cirurgias mutiladoras. O uso da quimioterapia como tratamento adjuvante à radioterapia já foi associado com recorrência reduzida e uma tendência de aumento da sobrevivência para câncer, depois de 30 anos de estudo de acompanhamento (McARDLE *et al.*, 2010). Mas quando a radioterapia e quimioterapia são administradas em conjunto, os efeitos agudos e tardios tornam-se importantes (GREEN *et al.*, 2001).

Mulheres na pré-menopausa submetidas à quimioterapia adjuvante para o tratamento de câncer de mama apresentam significativa perda óssea a partir do primeiro ano após o início do tratamento (SHAPEERO *et al.*, 2008). Esta alta taxa de perda de densidade mineral óssea pode levar ao aumento do risco de fraturas na pós-menopausa. Dados do “Women`s Health Initiative” mostram que mulheres na pós-menopausa, que sobreviveram ao câncer de mama, têm um risco 15% maior de sofrerem fraturas que mulheres sem histórico de câncer de mama (HERSHMAN *et al.*, 2010).

Alterações morfológicas nos ossos são tradicionalmente estudadas através de medidas feitas em duas dimensões, onde os parâmetros estruturais são inspecionados visualmente ou medidos de secções transversais das amostras. O método convencional

de histomorfometria (estereologia) envolve uma cuidadosa preparação da amostra, seguido de secções das amostras em lâminas bem finas. Apesar de o método apresentar alta resolução espacial e alto contraste, é um método tedioso, consome muito tempo e necessita de um técnico treinado para preparação e quantificação (MÜLLER *et al.*, 1998).

Muitos estudos com morfologia dos ossos têm sido feitos com o auxílio da microtomografia computadorizada (μTC). FELDKAMP, *et al.* (1989) apresentam uma técnica para se estudar a estrutura trabecular através da μTC com a vantagem de ser uma técnica não-destrutiva e os cálculos poderem ser feitos por um computador. Feldkamp apresenta neste seu trabalho uma técnica para avaliar quantitativamente as estruturas ósseas, tais como a razão entre volume ósseo e volume total da amostra (BV/TV); a razão entre a superfície óssea e seu volume (BS/BV); a separação média entre as trabéculas (Tb.Sp); a densidade de trabéculas (Tb.N) e a espessura média das trabéculas (Tb.Th).

WERNLE *et al.* (2010) avaliaram parâmetros histomorfométricos em relação ao tempo após a irradiação, e à dose aplicada em ratos. As medidas foram feitas com um tomógrafo médico e resolução de 12 μ m. Os índices BV/TV, Tb.Th e Tb.N calculados em fêmures de ratos diminuíram significativamente com o tempo pós-irradiação (6, 12, 26 semanas), não sendo significativo para o tempo de 2 semanas pós-irradiação, enquanto Tb.Sp aumentou com o tempo pós-irradiação. O volume cortical aumentou com tempo e também com a dose (5 Gy e 20 Gy). Tb.Th aumentou em função da dose. WERNLE *et al.* destacam ainda que o grupo irradiado com 20 Gy perdeu quase todo o osso trabecular.

NOGUEIRA *et al.* (2011a) avaliaram os efeitos da radiação em fêmures de ratos submetidos a simulações de radioterapia através da microtomografia computadorizada por luz síncrotron. Os resultados mostraram que há tendência de alterações em alguns parâmetros histomorfométricos, sendo mais destacados em certas regiões do fêmur.

Em outro trabalho, NOGUEIRA *et al.* (2011b) estudaram os mesmos efeitos, incluindo costelas e outras amostras de fêmures. Os resultados mostraram a tendência a mudanças na microestrutura das costelas, assim como nos fêmures.

A técnica de microtomografia computadorizada permite obtenção de imagens com resolução na ordem de micrômetros. Porém, para obtenção de uma resolução nesta ordem de grandeza, é necessário que a fonte de raios X seja dotada de um tamanho focal bastante pequeno, o que acaba limitando a intensidade de feixe de raios X. Outro ponto negativo no uso de raios X convencional para geração de imagens é o fato ser policromático. Isto faz com que fótons de menor energia sejam mais absorvidos que os de maior energia, causando o chamado endurecimento do feixe. Um feixe policromático gera pouco contraste em amostras pouco densas, principalmente quando a amostra é composta de dois materiais com coeficientes de atenuação muito distantes ou muito próximos. Para que seja possível a geração de imagens destes tipos de amostras com melhor contraste, é necessário que se tenha um feixe de raios X monocromático.

Os síncrotrons são capazes de gerar um feixe de raios X extremamente intensos, colimados e com um alto grau de coerência espacial. E com a utilização de cristais monocromadores é possível obter feixes praticamente monocromáticos com energia selecionável dentro de um amplo espectro de energias. Estas características são perfeitas para obtenção das microtomografias.

Com o desenvolvimento destas fontes de feixes intensos como os síncrotrons, a microfluorescência de raios X (μ XRF) se tornou possível num nível ainda mais sofisticado. A μ XRF é capaz de fornecer, além da distribuição dos elementos químicos de forma bidimensional da superfície da amostra, podem fornecer ainda suas concentrações, com excelente resolução espacial e limite de detecção respectivamente. A técnica é usada em diversas áreas como meio ambiente, indústria e médica.

Alterações na composição elementar óssea podem ser de grande importância para entender alterações algumas doenças como osteoporose (WANG *et al.*, 2008). A distribuição dos elementos no interior de uma amostra de osso pode ser avaliada a partir da técnica de micro-fluorescência de raios X (μ XRF). Esta técnica permite um mapeamento ponto a ponto de um corte da amostra, possibilitando avaliar a distribuição de elementos na região do osso em questão.

A distribuição de alguns elementos nos ossos que sofreram processo de irradiação pode revelar alterações na concentração e distribuição destes elementos. Esta

técnica, em conjunto com a análise microestrutural podem potencializar o processo de entendimento das possíveis alterações devido radioterapia.

1.1 Objetivos

O objetivo principal desta tese foi de avaliar alterações nas microestruturas de costelas de ratos submetidos a procedimentos de radioterapia, através da microtomografia computadorizada por luz síncrotron e da microfluorescência de raios X.

Para alcançar o objetivo principal, destacam-se alguns objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade do uso da técnica de tomografia por luz síncrotron para quantificação histomorfométrica de costelas de ratos irradiados em simulação radioterápica para câncer de mama;
- Avaliar alterações devido a diferentes qualidades de radiação (fótons e elétrons);
- Comparar os resultados em diferentes períodos pós-irradiação;
- Avaliar alterações da distribuição mineral nas diferentes regiões da costela, devido à irradiação;

1.2 Justificativa

Estudos de acompanhamentos de pacientes que foram submetidos a doses de radiação para tratamento de câncer mostraram que o tratamento radioterápico pode resultar em um aumento do risco de fratura (CEDERMARK *et al.*, 1995, CEDERMARK *et al.*, 1996). Pacientes que passaram por tratamento radioterápico tiveram o dobro de chance de serem admitidos no hospital por fratura do quadril, quando comparados com pacientes que não passaram por tratamento radioterápico.

Estudos recentes mostram que mulheres submetidas à radioterapia para câncer de mama têm aumento do risco de fratura de costelas (PETTERSSON *et al.*, 2009). Algumas pesquisas sugerem que o principal motivo seja devido à costela estar presente no campo de tratamento da radioterapia para câncer de mama, recebendo assim doses de radiação.

Considerando o surgimento anual de novos casos de câncer de mama e a submissão de boa parte dos pacientes ao tratamento de radioterapia, torna-se de grande importância a compreensão dos efeitos no tecido ósseo sadio, induzidos por estes tratamentos.

A análise das microestruturas ósseas e a criação de um banco de dados com dados histomorfométricos relacionados ao tempo pós-irradiação, à energia de feixe utilizada, à qualidade de feixe utilizado, tipo de osso irradiado, à dose recebida e se o tratamento é concomitante ou não com a quimioterapia, devem ser correlacionados sendo desta maneira, valiosos para um planejamento do tratamento do câncer mais eficaz, de forma a reduzir os riscos de fraturas decorrentes dos tratamentos de câncer.

CAPÍTULO II

II FUNDAMENTOS TEÓRICOS

II.1 A Tomografia Computadorizada

A tomografia computadorizada (TC) é uma técnica de ensaio não-destrutivo que permite a obtenção de imagens de uma seção de um corpo de prova, através de um conjunto de projeções do plano e com o auxílio de um computador com um programa de reconstrução de imagens. A tomografia computadorizada por transmissão foi desenvolvida por Godfrey N. Hounsfield em 1972 (HOUNSFIELD, 1973), o que lhe rendeu o prêmio Nobel de medicina em 1979.

Com o avanço da tecnologia de detectores e tubos de raios X, e também com o objetivo de redução de dose e tempo de aquisição de dados, os sistemas tomográficos evoluíram, dando origem a vários tipos de tomógrafos. São divididos em tomógrafos de primeira, segunda, terceira, quarta, quinta e sexta gerações. A introdução destes tomógrafos visava principalmente à redução de dose no paciente e a redução do tempo de aquisição, devido à necessidade de manter o paciente imóvel durante a aquisição (KALENDER, 2006).

Em uma radiografia simples, o que se consegue visualizar é uma imagem planar, onde os objetos em diferentes profundidades aparecem num único plano. No entanto, através de uma única radiografia, a determinação do coeficiente de atenuação se torna inviável, já que ele varia ponto a ponto. A técnica de tomografia visa justamente superar esta dificuldade utilizando, ao invés de uma única, diversas radiografias distribuídas em intervalos regulares em torno do corpo de prova. Na técnica de TC, podem-se obter fatias deste objeto possibilitando a visualização de pontos em qualquer que seja sua profundidade.

O princípio de aquisição de uma tomografia é basicamente composto por um ou vários detectores colocados diametralmente opostos a uma fonte de raios X, e um corpo de prova situado no caminho do feixe, conforme a Figura II.1. Para que se possa obter a imagem de uma seção de um corpo de prova – comumente chamado de tomograma – é

necessário que se obtenham várias projeções, em passos angulares constantes (BRAZ, 1997).

A reconstrução das imagens tomográficas requer uma matemática um tanto complexa.

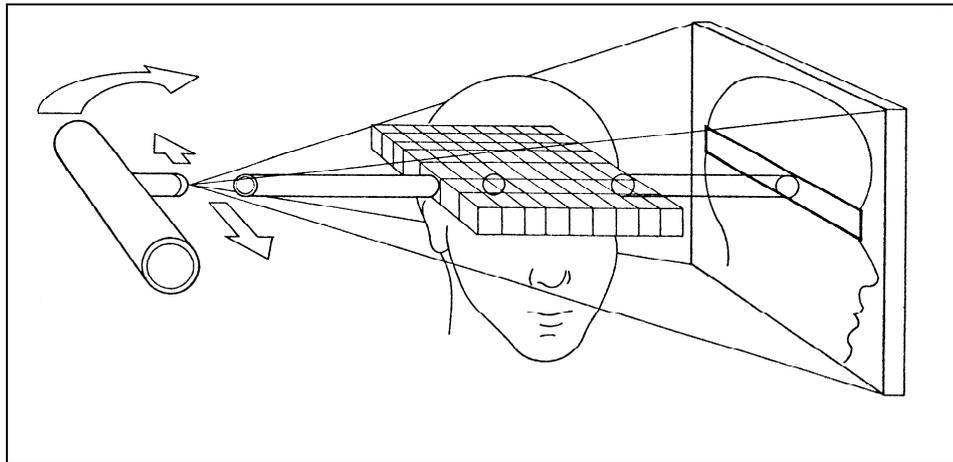


Figura II.1 – Princípio de aquisição de uma tomografia (BRAZ, 1997).

II.2 A Reconstrução de Imagens Tomográficas

As técnicas de reconstrução de imagens foram desenvolvidas primeiramente para uso na radioastronomia, na década de 50, com o propósito de identificar regiões do sol que emitiam microondas e assim tentar construir um mapa do sistema solar. O mesmo problema matemático foi levantado na microscopia eletrônica, no estudo de biomoléculas complexas. Neste caso o objetivo era reconstruir a estrutura molecular a partir de uma série de microgramas de transmissão tomados em vários ângulos diferentes. (BROOKS & DI CHIRO, 1976)

Na área médica, o tomógrafo foi introduzido em 1972 (HOUNSFIELD, 1973), o que causou um grande impacto no diagnóstico em radiologia.

A teoria de reconstrução tomográfica se baseia na determinação dos coeficientes de atenuação ao longo do corpo de prova sob uma perspectiva matemática.

O matemático J. Radon elaborou, em 1917, uma transformada na qual se integra uma função ao longo de linhas oblíquas com vários ângulos e várias distâncias da origem do sistema de coordenadas da função. A transformada de Radon não teria tanta

relevância na área da Física Nuclear se não fosse percebido que esta transformação ocorre justamente no processo tomográfico.

O problema consiste em determinar os coeficientes de atenuação $\mu(x,y)$ em cada ponto do corpo de prova. Como já foi exposto, a determinação do coeficiente de atenuação pode ser calculado a partir da equação II.1, onde a integral corresponde ao raio-soma, sendo este a soma de todos os coeficientes de atenuação numa determinada direção (BARROSO, 1997).

$$\int_{\text{raio}} \mu(s) ds = \ln \frac{I_o}{I} \quad \text{Eq II.1}$$

Considerando $f(x,y)$ uma função bidimensional, as linhas que cortam esta função em qualquer direção (Figura II.2) são chamadas de raios. A integral de linha ao longo destes raios é chamada integral de raio, ou raio-soma, e um conjunto de raios-soma, paralelos ou divergentes, forma uma projeção $P(t)$. No caso de raios paralelos, uma projeção pode ser descrita matematicamente por

$$P_\theta(t) = \int_{AB} f(x, y) ds \quad \text{Eq II.2}$$

onde AB define a linha ao longo do qual a integral será calculada, t é a posição do raio-soma dentro da projeção, ds é o passo infinitesimal ao longo do raio e θ é a inclinação da linha AB em relação ao sistema de coordenadas XY , a partir do eixo y . O raio AB pode ser expresso matematicamente pela equação

$$t = x \cos \theta + y \sin \theta \quad \text{Eq II.3}$$

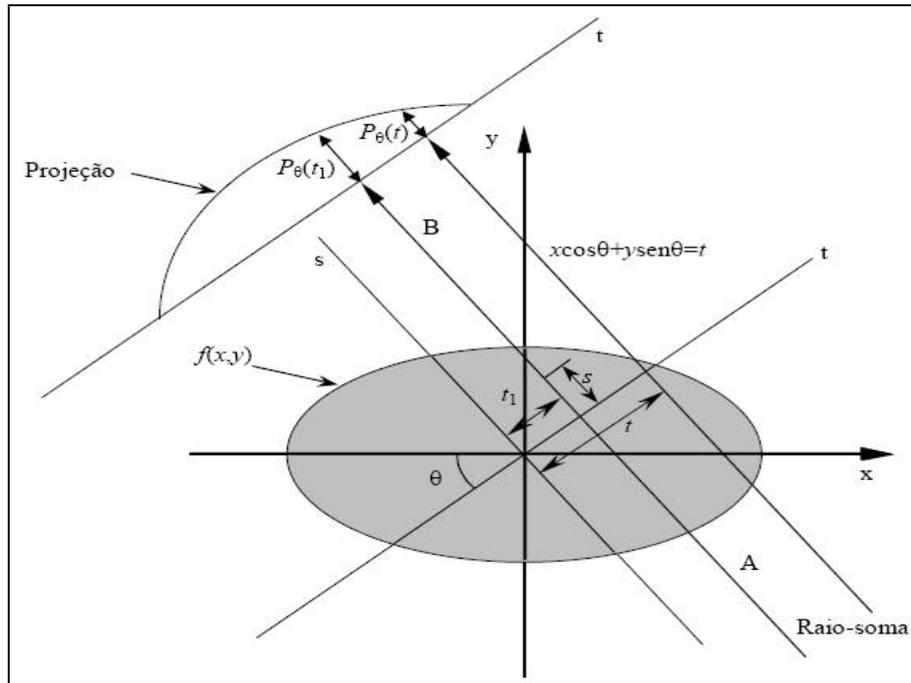


Figura II.2 – Representação esquemática dos raio-soma (BARROSO, 1997)

Ou seja, para um certo ângulo θ , somente as coordenadas x e y que satisfazem a equação II.3 estarão sobre a linha AB e somente os pontos com estas coordenadas que irão contribuir com a integral de linha $P_\theta(t)$. O restante da função fora da linha AB não entrará no cálculo da integral para a posição t na projeção. Uma pseudofunção geralmente usada na matemática para esta situação é o delta de Krönecker $\delta(u)$. Ele é representado da seguinte forma:

$$\delta(u) = \begin{cases} 1, & \text{se } u = 0 \\ 0, & \text{se } u \neq 0 \end{cases} \quad \text{Eq II.4}$$

Então, sabendo que somente as coordenadas x e y que satisfazem a equação $x \cos \theta + y \sin \theta - t = 0$ que vão entrar no cálculo das projeções. Pode-se substituir a integral de linha pela integral dupla, da seguinte forma:

$$P_\theta(t) = \int_{AB} f(x, y) ds = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy \quad \text{Eq II.5}$$

ou seja, se x e y estão sobre a linha AB , teremos $x \cos \theta + y \sin \theta - t = 0$, o que implica em $\delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) = \delta(0) = 1$, então:

$$\int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - t) dx dy = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) dx dy \quad \text{Eq II.6}$$

A função $P_{\theta}(t)$ tendo o valor de θ fixo, e somente t como variável, define uma projeção paralela, ou seja, aquela tomada ao longo de um conjunto de raios paralelos. Raios-soma divergentes também podem ser tomados para formar uma projeção. Tais projeções são chamadas de projeções de feixe em leque, uma vez que os raios-soma são divergentes, e neste caso, cada raio-soma contido na projeção em leque corresponderá a um ângulo θ diferente, isto é, cada raio-soma terá uma inclinação em relação ao eixo Y.

Retornando ao problema de determinação dos coeficientes de atenuação, tem-se que cada raio-soma é resultado da integral dos coeficientes de atenuação ao longo de um raio. Torna-se familiar que se $\mu(x,y)$ é uma função bidimensional tal como $f(x,y)$ no modelo matemático, então a integral de linha acima corresponde a um raio-soma $P_{\theta}(t)$. Se o corpo de prova é translado ao longo de uma trajetória perpendicular ao feixe de radiação e, a intervalos regulares deste deslocamento, levantaremos os valores de I . Então podem-se calcular os raios-soma correspondentes a cada intervalo e formar uma projeção paralela. Se o instrumento de medida for extenso e constituído de vários elementos detectores independentes, podem-se levantar os valores de I e gerar uma projeção em leque. Estas projeções paralelas e em leque serão utilizadas para calcular os coeficientes de atenuação do corpo de prova através do teorema da fatia de Fourier, cujo resultado é equivalente a uma “transformada inversa” de Radon.

II.2.1 Teorema da Fatia de Fourier

Inicia-se o teorema formulando a transformada de Fourier da função bidimensional $f(x,y)$ e da projeção $P_{\theta}(t)$ (BARROSO, 1997).

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-j2\pi(ux+vy)} dx dy \quad \text{Eq II.7}$$

$$S_{\theta}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta}(t) e^{-j2\pi\omega t} dt \quad \text{Eq II.8}$$

Igualando-se a variável v da transformada $F(u,v)$ a zero, nota-se que a expressão final se resume na transformada da projeção inicial ($\theta = 0$), como apresentado a seguir.

$$\begin{aligned}
F(u,0) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) e^{-j2\pi x} dx dy \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} \left[\int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) dy \right] e^{-j2\pi x} dx \\
&= \int_{-\infty}^{\infty} P_0(t) e^{-j2\pi t} dt = S_0(\omega)
\end{aligned}
\tag{Eq II.9}$$

As variáveis (u,v) e (ω,θ) estão relacionadas entre si através das funções trigonométricas

$$\begin{aligned}
u &= \omega \cdot \cos \theta \\
v &= \omega \cdot \sin \theta
\end{aligned}
\tag{Eq II.10}$$

Assim, representar a transformada de $f(x,y)$ por $F(u,v)$ ou por $F(\omega,\theta)$ tem o mesmo efeito, e mais, $F(u,0) = F(\omega,0) = S_0(\omega)$. Resta mostrar que o resultado anterior é válido para qualquer $\theta \neq 0$. Para isso, substituem-se as variáveis x e y por duas outras (t e s) que são variáveis de um sistema de coordenadas cartesianas girado de um ângulo θ que coincide com o sistema de coordenadas das projeções. Verificando-se a Figura II.2, onde tem-se uma projeção paralela, vê-se que a coordenada s coincide com a direção do raio-soma e que a coordenada t corresponde ao eixo perpendicular aos mesmos raios-soma e que é paralela à direção da projeção. Desta forma, (t,s) e (x,y) estão ligadas através de uma matriz de rotação

$$\begin{bmatrix} t \\ s \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & \sin \theta \\ -\sin \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix}
\tag{Eq II.11}$$

ou seja, qualquer ponto (x,y) de f possui coordenadas (t,s) calculadas por meio da matriz de rotação acima. Reescrevendo a equação do raio-soma em função das novas variáveis t e s , tem-se que

$$P(t) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t,s) ds
\tag{Eq II.12}$$

e a transformada de Fourier da projeção é

$$S_{\theta}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta}(t) e^{-j2\pi\omega t} dt = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(t,s) ds e^{-j2\pi\omega t} dt \quad \text{Eq II.13}$$

Retornando ao sistema de coordenadas de x e y e substituindo t por $x\cos\theta + y\sin\theta$, conclui-se que

$$\begin{aligned} S_{\theta}(\omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) e^{-j2\pi\omega(x\cos\theta + y\sin\theta)} dx dy \\ &= F(u,v) \text{ para } u = \omega\cos\theta, v = \omega\sin\theta \\ &= F(\omega,\theta) \end{aligned} \quad \text{Eq II.14}$$

Por fim, se as informações de cada projeção $P_{\theta}(t)$ estão disponíveis, pode-se calcular sua transformada $S_{\theta}(\omega)$ que, como deduzido acima, equivale à transformada $F(\omega,\theta)$. Como $F(\omega,\theta)$ e $F(u,v)$ são equivalentes, calcula-se a função $f(x,y)$ original através de uma simples transformação inversa.

$$f(x,y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u,v) e^{j2\pi(ux+vy)} dudv \quad \text{Eq II.15}$$

Voltando mais uma vez ao problema da determinação dos coeficientes de atenuação, se além de se transladar o corpo de prova, ele for girado de um passo angular $\Delta\theta$ ao final de cada uma das translações, formam-se as projeções $P_i\Delta\theta(t)$ necessárias para se reconstruir a informação original do corpo de prova.

II.2.2 Reconstrução por Retroprojeção 2D

Um fato interessante deve ser notado quando se reconstruir a função $f(x,y)$. Como os raios-soma de cada projeção são paralelos, ao compararem-se as projeções de um ângulo θ e $\theta+180^\circ$, percebe-se que estas projeções possuem os mesmos valores, porém em ordem inversa. Isto significa que não há necessidade de se utilizar todas as projeções ao longo dos 360° em torno do corpo de prova, mas somente metade delas. Isso pode ser visto nas equações abaixo.

$$f(x,y) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} F(\omega,\theta) e^{j2\pi\omega(x\cos\theta + y\sin\theta)} \omega d\omega d\theta \quad \text{Eq II.16}$$

$$f(x, y) = \int_0^\pi \int_0^\infty F(\omega, \theta) e^{j2\pi\omega(x \cos\theta + y \sin\theta)} \omega d\omega d\theta$$

$$+ \int_0^\pi \int_0^\infty F(\omega, \theta + \pi) e^{j2\pi\omega(x \cos(\theta+\pi) + y \sin(\theta+\pi))} \omega d\omega d\theta$$

Eq II.17

$$F(\omega, \theta + \pi) = F(-\omega, \theta)$$

Eq II.18

Uma vez estabelecida a necessidade de se usar somente as projeções contidas entre 0 e π , pode-se partir para a equação de reconstrução propriamente dita. Uma vez que $F(\omega, \theta)$ é igual a $S_\theta(\omega)$, substitui-se a primeira pela segunda na equação de transformação inversa.

$$f(x, y) = \int_0^\pi \left[\int_{-\infty}^\infty F(\omega, \theta) |\omega| e^{j2\pi\omega(x \cos\theta + y \sin\theta)} d\omega \right] d\theta$$

$$= \int_0^\pi \left[\int_{-\infty}^\infty S_\theta(\omega) |\omega| e^{j2\pi\omega(x \cos\theta + y \sin\theta)} d\omega \right] d\theta$$

Eq II.19

O termo entre colchetes deve ser interpretado como a transformada inversa do produto de dois espectros de frequência, um espectro correspondendo à transformada da projeção $P_\theta(t) - S_\theta(\omega)$, e outro correspondendo ao espectro do filtro $|\omega|$. O inverso do produto entre dois espectros é igual à convolução entre as respectivas inversas. Esta propriedade é usada na implementação do algoritmo de reconstrução 2D (feixe paralelo).

Desta forma, nomeando a inversa do produto dos espectros de $Q_\theta(t)$, chega-se a uma forma compacta da equação de reconstrução.

$$Q_\theta(t) = \int_{-\infty}^\infty S_\theta(\omega) |\omega| e^{j2\pi\omega t} d\omega \quad \therefore \quad t = x \cos\theta + y \sin\theta$$

Eq II.20

$$f(x, y) = \int_0^\pi Q_\theta(x \cos\theta + y \sin\theta) d\theta$$

Eq II.21

No caso da reconstrução 2D com feixe divergente (em leque), as equações de reconstrução bidimensional são adaptadas por relações trigonométricas. As equações para reconstrução 2D com feixe divergente são apresentadas com detalhes por (OLIVEIRA, 2002)

O termo $|\omega|$ surgiu devido à mudança do sistema de coordenadas (de retangulares para polares). Matematicamente é conhecido como Jacobiano. No âmbito de reconstrução de imagens, $|\omega|$ é popularmente chamado de “filtro”. Este “filtro” possui um comportamento que enfatiza as altas frequências presentes nas projeções adquiridas no sistema tomográfico. Sendo $\omega(\xi)$ uma função janela de limitação de banda que é escolhida para dar uma resposta em alta frequência, mais moderada, para alcançar o melhor compromisso entre a largura de banda do filtro e a supressão de ruído, podem ser acoplados outros filtros dentro das equações de retroprojeção onde se encontrava somente o filtro rampa $|\omega|$, de forma a minimizar o efeito de ênfase das altas frequências. Existem quatro filtros comumente utilizados para esta suavização (Tabela II.1).

Tabela II.1 – Filtros de reconstrução.

Filtro	Resposta em Frequência
Ram-Lak	$ \xi \text{rect}(\xi d)$
Shepp-Logan	$ \xi \sin c(\xi d) \text{rect}(\xi d)$
Co-seno Passa Baixa	$ \xi \cos(\xi d) \text{rect}(\xi d)$
Generalizado de Hamming	$ \xi [\alpha + (1 - \alpha) \cos 2\pi \xi d] \text{rect}(\xi d), 0 \leq \alpha \leq 1$

Nota-se que existe um termo nos filtros de suavização apresentados que é justamente o filtro *Ram-Lak*, definido pela equação II.22, e da composição deles tem-se uma redução ou ênfase dos defeitos e detalhes do objeto a ser reconstruído.

$$\omega(\xi) = |\xi| \text{rect}(\xi d) \quad \text{Eq II.22}$$

Os gráficos de resposta em frequência e resposta impulsiva dos filtros descritos acima são mostrados na Figura II.3.

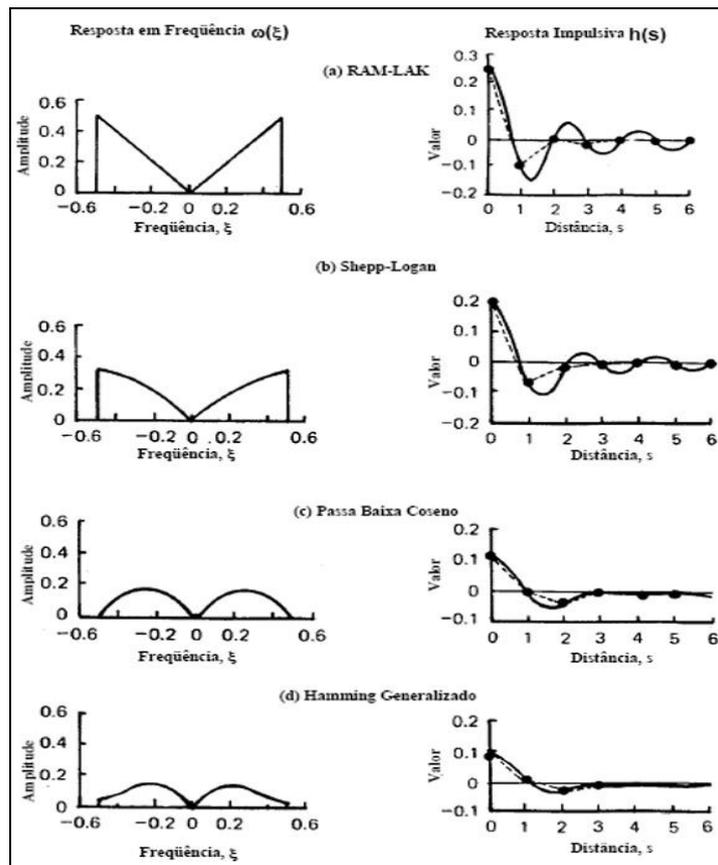


Figura II.3 – Filtros utilizados na reconstrução (OLIVEIRA, 2002)

II.3 Quantificação dos Dados Tomográficos

O resultado final de uma tomografia é um conjunto de dados que representa o objeto analisado através dos seus coeficientes lineares de atenuação. Visualmente, estes dados são muito importantes, quando o que se deseja é a detecção de artefatos, ou falhas naquela amostra. Porém, para uma análise quantitativa da estrutura da amostra, só os coeficientes de atenuação não são suficientes, já que, o que se quer é levantar a correlação espacial entre *voxels*. Com isso, surge a necessidade de extrair novos parâmetros que sejam capazes de representar, de forma adequada, algumas medidas específicas tais como: volumes, áreas, espessuras e comprimentos.

Este tipo de quantificação espacial já vem sendo realizado há muito tempo na área de médica, mais comumente na histologia. A histologia é a ciência que estuda a estrutura dos tecidos e umas das formas práticas de quantificar um tecido é gerando lâminas bem finas de amostras do tecido, de forma a aproximar-se ao máximo do contexto geométrico de uma seção, e que ao ser observado no microscópio, ele se

apresenta como uma imagem bidimensional. Esta imagem contém uma projeção da estrutura tridimensional em forma de uma lâmina (2D) (MÜLLER *et al.*, 1998).

A estereologia corresponde a um conjunto de técnicas de análise de imagens 2D destinado à determinação de parâmetros tridimensionais de um órgão, tecido ou estrutura (no caso das aplicações biomédicas), partindo-se do estudo de cortes bidimensionais. Utilizam-se a geometria probabilística e um pouco de matemática para as estimativas. Sobre as imagens dos cortes (imagens bidimensionais) sobrepõem-se sistemas-teste para a aquisição dos dados. Normalmente um sistema-teste tem área, número de pontos-teste e comprimento de linha-teste conhecidos e estes são usados em fórmulas para calcular diversos parâmetros, como por exemplo densidades de volume (%), de comprimento (mm/mm^3) e de superfície (mm^2/mm^3) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003)

O fato de a técnica tomográfica já nos fornecer os conjuntos de reconstruções bidimensionais, faz com que seja possível uma ligação entre a quantificação estereológica e a tomografia. Os cortes histológicos são substituídos pelas projeções bidimensionais (correspondendo às seções transversais da amostra). A maior vantagem da tomografia vem do fato de ser um método não destrutivo.

A estereologia, como já visto anteriormente, quantifica uma amostra tridimensional a partir de extrapolações das quantidades de duas dimensões. No entanto, na tomografia tridimensional é possível quantificar a amostra por completo, já que os dados são dispostos de uma só vez, não havendo necessidade de extrapolações, sendo as quantificações realizadas em todo o volume da amostra. Este método de quantificação estereológica recebe o nome, na histologia, de histomorfometria (OLIVEIRA, 2002)

II.3.1 Quantificação Histomorfométrica Através da Tomografia Computadorizada 3D (TC-3D)

Na estereologia, as medidas são realizadas baseadas em contagem de pontos, linhas e áreas nas seções bidimensionais através de um microscópio, de onde se obtêm os chamados parâmetros básicos. Na tomografia computadorizada não é diferente, já que o produto final do processo tomográfico são seções bidimensionais paralelamente

dispostas, onde os *pixels* são os menores pontos formadores da imagem. Na tomografia, esta quantificação é feita através de um computador (CHAPPARD *et al.*, 2006).

Os principais parâmetros que devem ser extraídos das imagens 3D são a fração de volume ósseo (BV/TV) e a razão da superfície óssea pelo volume ósseo (BS/BV). A partir destes parâmetros, outros três parâmetros são calculados. São eles: a largura trabecular média (Tb.Th), a separação média entre as trabéculas (Tb.Sp) e a densidades média das trabéculas (Tb.N) (MARTÌN-BADOSA, *et al.*, 2003).

O parâmetro básico BS corresponde à superfície livre da amostra, em contato direto como espaço vazio (numa imagem binarizada, como veremos mais adiante), ou a área total da interface entre dois materiais. BV é o volume de matéria dentro da amostra analisada. Se o objeto é uma amostra de osso, BV é o volume de osso da amostra. E TV é o volume total analisado.

O parâmetro BV/TV indica a fração de matéria no volume selecionado, e é expresso em (%) e BS/BV indica o grau de fragmentação da amostra e é expresso em (mm^2/mm^3).

FELDKAMP *et al.* (1989) apresentam um método de levantamento dos parâmetros histomorfométricos a partir de imagens tomográficas. Embora o objetivo final de FELDKAMP *et al.* seja o acesso direto à microestrutura tridimensional, o método oferece diversas vantagens quando aplicado em analogia ao método histomorfométrico convencional. As seções (ou fatias) podem ser obtidas de forma não destrutiva formando um conjunto de planos paralelos entre si através da TC-3D usando feixe cônico. Os planos podem ser examinados sequencialmente e de maneira sistemática, sem a necessidade de um observador para preparar, examinar e trocar as lâminas, já que quem faz este trabalho é o computador.

A fim de se diferenciar o osso do restante do tecido, deve-se primeiro binarizar a imagem. O processo de binarização consiste na escolha de um valor limiar (*threshold*) 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 (Figura II.4), este valor saturado vale 256. De forma análoga, todos os *pixels* que tiverem valor inferior ao do limiar, serão convertidos em 0 (zero). O

resultado é uma imagem preta e branca, onde a fase branca corresponde ao tecido ósseo e a fase preta é o restante do tecido (não quantificado).

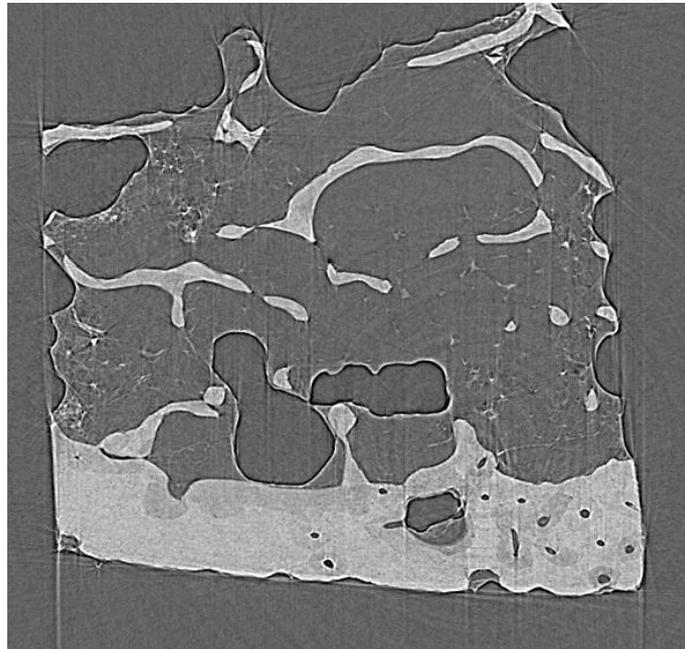


Figura II.4 – Imagem de tomografia de osso de 8-bits. (NOGUEIRA, 2008)

A escolha de um valor de limiar é crítico neste método (DING *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 1998), pois depende das características do sistema tomográfico, em especial, das características energéticas do feixe de raios X. Uma ferramenta útil na escolha do limiar é o histograma da imagem. No histograma, pode-se observar a distribuição dos valores dos *pixels* da imagem e buscar um valor que separe "razoavelmente bem" a distribuição correspondente ao da fase de interesse do restante (Figura II.5). A característica energética do feixe interfere na qualidade do histograma. Quando o feixe é monoenergético e os coeficientes de atenuação das fases componentes da microestrutura não são muito próximas, as distribuições de cada fase ficam bem destacadas umas das outras, o que facilita a escolha do limiar (OLIVEIRA & LOPES, 2004).

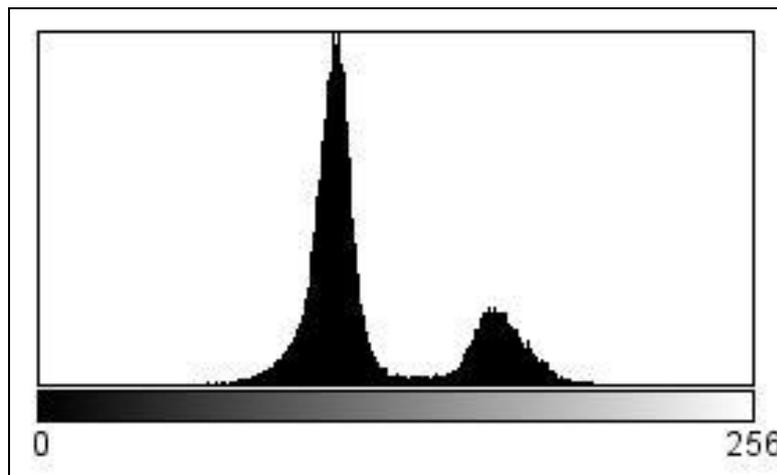


Figura II.5 – Histograma de uma imagem tomográfica 2D de 8-bit.

Com a imagem binarizada (Figura II.6), o passo seguinte é o cálculo dos parâmetros básicos P_P e P_L que podem ser obtidos diretamente para todas e quaisquer seções da reconstrução 3D. P_P e P_L são obtidos da imagem binarizada 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 ; que corresponde ao índice BV/TV. 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 . O valor de BS/BV é determinado pela equação $2P_L/P_P$. De posse dos dois parâmetros primários, todos os outros podem ser calculados (OLIVEIRA & LOPES, 2004, NOGUEIRA *et al.*, 2010).

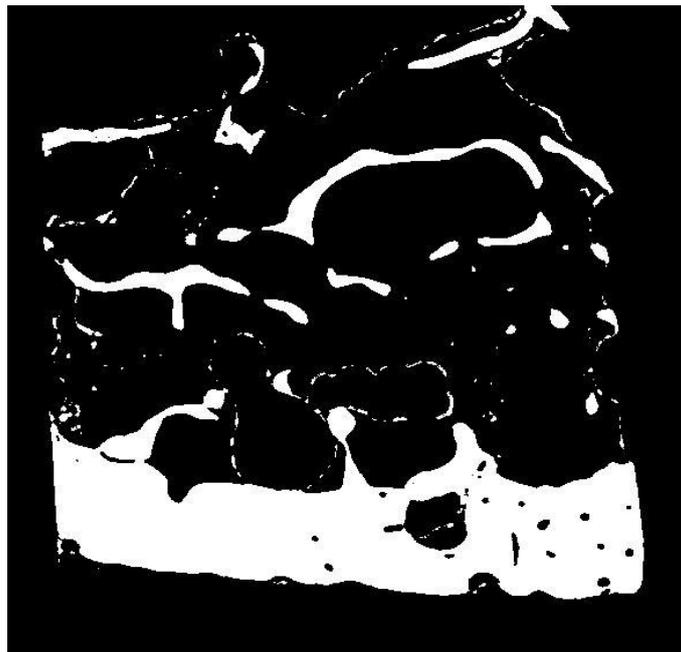


Figura II.6 – Imagem de tomografia de osso binarizada

Os parâmetros secundários são calculados a partir dos valores de BV/TV e BS/BV, conforme apresentados na Tabela II.2

Tabela II.2 – Relação dos parâmetros secundários (OLIVEIRA & LOPES, 2004).

Parâmetro	Equação
Tb.Th	$\frac{2BV}{BS}$
Tb.N	$\frac{BS}{2TV}$
Tb.Sp	$\frac{2(TV - BV)}{BS}$

II.4 Fluorescência de Raios X

A fluorescência de raio X (XRF – X-Ray Fluorescence) é uma técnica multielementar capaz de fornecer informações quantitativas e qualitativas sobre a composição elementar de uma variedade de materiais de maneira não-destrutiva. A XRF é normalmente empregada para análises de amostras biológicas, geológicas, industriais, dentre outras.

A técnica de XRF é baseada na medida das intensidades dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos componentes de uma amostra, quando devidamente excitados. Quando uma amostra é irradiada com um feixe de fótons de energia maior que a energia de ligação eletrônica daquele átomo na amostra, alguns elétrons tendem a ser ejetados deste átomo. Com isso, estes átomos que tiveram elétrons ejetados são ditos átomos ionizados. Átomos ionizados são instáveis e, de maneira praticamente instantânea, iniciam um processo de transição eletrônica de forma a preencher as vacâncias deixadas pelos elétrons ejetados. Uma das conseqüências é a emissão de raios X característicos, cuja energia é igual à diferença entre as energias de seu estado inicial e de seu estado final e é diretamente proporcional ao quadrado do número atômico do elemento excitado (SIMABUCO, 1993). Esta energia é bem definida para cada elemento, por isso são chamados de raios X característicos. A energia mínima para arrancar elétrons das camadas K e L (energia de ligação) pode ser calculada de modo aproximado, aplicando-se a teoria atômica de Bohr para o átomo de hidrogênio e átomos de hidrogenoides.

Na análise qualitativa, a XRF possui seletividade incomparável para todos os elementos entre o berílio e o urânio e até mesmo para elementos transurânicos; além de uma ampla faixa dinâmica na análise quantitativa (ppm). A intensidade de qualquer linha espectral é proporcional ao número de átomos emitindo fótons de energias atribuídas a esta linha. Porém, uma simples proporcionalidade linear não é regra, e vários fatores devem ser levados em conta numa quantificação como, por exemplo, métodos de correção do efeito matriz e absorção (VAN GRIEKEN & MARKOWICZ, 2002).

A XRF é baseada em duas técnicas de análise: a fluorescência de raios X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF – Wavelength-Dispersive X-ray Fluorescence) e a fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF – Energy-Dispersive X-ray Fluorescence).

No início da década de 60, a XRF era realizada somente pela técnica de WDXRF, em que cristais apropriados são necessários para que feixes secundários sejam gerados baseados na lei de Bragg. A técnica de WDXRF não exige detectores com alta eficiência – no início utilizavam-se detectores a gás (detectores proporcionais, por

exemplo), já que o feixe sofre interferência no cristal difrator antes de chegar ao detector, sofrendo assim uma moderada discriminação em energia, suficiente para serem resolvidos pelo detector. A WDXRF exige uma alta intensidade de raios X, devido a atenuação no cristal, que acaba reduzindo a intensidade de radiação.

Inicialmente a técnica de EDXRF usava também detectores proporcionais ou cintiladores para determinar diretamente a energia dos raios X. Tais sistemas eram limitados em suas aplicações por causa da resolução em energia inerentemente pobre, que impedia a separação dos raios X característicos dos elementos adjacentes na tabela periódica.

O início da EDXRF veio no fim dos anos 60, com a chegada dos detectores de diodo semicondutores de estado-sólido (BERTOLINI *et al*, 1965) e suas eletrônicas associadas. Mas foi na década de 70, com o desenvolvimento dos detectores semicondutores de Si(Li), capazes de discriminar raios X com energias bem próximas, que a EDXRF avançou verdadeiramente como uma excelente técnica multielementar.

II.4.1 Microfluorescência de raios X

Com a disponibilidade de fontes intensas, como a radiação síncrotron, e sistemas de detecção mais eficientes, foi possível desenvolver novos avanços na aplicação da XRF, principalmente em sistemas biológicos. Dentre estes avanços, a microfluorescência de raios X (μ XRF) é bastante utilizada no mapeamento elementar em amostras biológicas.

A μ XRF é uma técnica muito utilizada para o mapeamento elementar em diversos tipos de materiais (BERNASCONI, 1994), diferenciando da EDXRF principalmente nas dimensões e geometria do feixe. O mapeamento elementar permite analisar a composição da superfície inteira, fornecendo imagens em cores com significativa quantidade de informações sem a necessidade de uso de extensivas tabelas. As variações das cores indicam as diferenças nas intensidades relativas dos elementos presentes na amostra. Estes mapas são obtidos através da varredura na amostra com um feixe de raios X e consequente coleta dos dados nas regiões selecionadas de energia.

O mapeamento elementar é realizado dividindo-se a área a ser analisada em elementos, e em cada elemento, obtém-se um espectro de fluorescência de raios X

(PRINS, 1984). Basicamente, um feixe primário de raios X irradia a amostra e induz a emissão de fluorescência de raios X numa região da amostra (aprox. 30 μm). Um detector semiconductor coleta a radiação fluorescente que transporta informações sobre a composição local da amostra. Esta amostra então é movida por motores controlados por um computador, permitindo assim obterem-se informações do próximo ponto (Figura II.7). Este procedimento é realizado de forma a varrer toda a amostra em análise. Como o feixe de radiação deve ser bem pequeno, a intensidade passou a ser um desafio. Porém este desafio foi facilmente superado com o uso da radiação síncrotron (BERNASCONI, 1994).

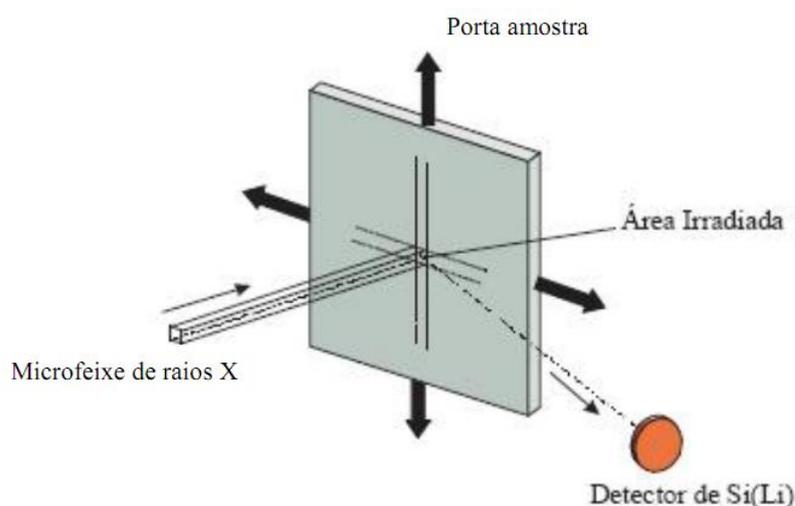


Figura II.7 – Esquema experimental para mapeamento por μXRF

A μXRF é considerada uma excelente técnica para análise em amostras biológicas, graças ao baixo limite de detecção ($0,01\mu\text{g/g}$), tempo de medida relativamente baixo (alguns segundo em cada ponto – resultando num total de 2 - 3h para uma amostra pequena, com dimensões de $0,5 \times 0,5 \text{ mm}$).

II.4 Radiação Síncrotron

II.4.1 Características Gerais

Sempre que uma carga elétrica é acelerada, da mesma forma que elétrons oscilando numa antena, ela emite radiação eletromagnética. Uma partícula que é acelerada de forma harmônica gera um campo elétrico senoidal em função do tempo, e este oscila de acordo com a frequência do seu movimento. Se a velocidade da partícula for bem inferior à da luz, essa emissão tem o seu valor máximo para ângulos perpendiculares à direção de aceleração. Por outro lado, nas proximidades da velocidade da luz ocorrem mudanças interessantes na emissão de radiação, relacionadas com as frequências emitidas e a forma (direção) de como a partícula emite. Alterações mais profundas ocorrem a velocidades relativísticas no movimento circular em que o espectro de emissão de radiação torna-se quase-contínuo, apresentando uma infinidade de harmônicos da frequência fundamental de oscilação. Esta radiação é conhecida como luz síncrotron (CASTILHO, 2006).

A radiação ou luz síncrotron é produzida por aceleradores anulares nos quais circula uma corrente pulsada de elétrons de alta energia ($E \gg m_0c^2$) com velocidade praticamente igual à velocidade da luz. A radiação síncrotron é produzida pelo movimento circular destes elétrons em velocidades relativísticas nas tangentes às curvaturas de sua trajetória.

O processo de produção é iniciado por um canhão de elétrons de um acelerador linear. Os aceleradores lineares são aceleradores de partículas carregadas, como elétrons, prótons ou íons pesados. As partículas carregadas entram em um tubo onde existem campos elétricos alternados. Estas partículas são aceleradas primeiramente por um campo elétrico e entram em um tubo de corrente ou “*drift tube*” onde são protegidas do campo elétrico e o atravessam com velocidade constante até a próxima abertura. Neste ponto as partículas são novamente aceleradas e a cada abertura entre os tubos “*drifts*” as partículas recebem mais e mais energia. Esse processo é capaz de acelerar as partículas carregadas com energias muito grandes.

O feixe de elétrons gerado pelo acelerador linear é injetado em um anel de armazenamento, onde há três dispositivos básicos: os dipolos magnéticos, formados por

ímãs dipolares que produzem um campo magnético homogêneo no sentido vertical que são responsáveis pela deflexão do feixe e consequente produção de luz síncrotron; os quadripolos ou sextupolos que estão situados nos trechos retos do anel e servem para focalizar os elétrons e reduzir as aberrações cromáticas; e a cavidade de rádio frequência que está situada em um ou mais dos trechos retos e é responsável por acelerar os elétrons injetados a baixa energia até a energia final e por fornecer aos elétrons, em cada passagem pelo interior da mesma, a energia perdida em cada volta devido à radiação produzida nas partes curvas de suas trajetórias para aumentar o tempo de vida do feixe (MARGARITONDO, 1995).

A utilização de luz síncrotron pressupõe o uso de monocromadores de modo a selecionar a região desejada do espectro eletromagnético.

Os feixes de raios X que se podem obter em uma máquina de luz síncrotron são extremamente intensos, colimados e dotados de um elevado grau de coerência longitudinal (espacial). Além disso, com a utilização de cristais monocromadores, é possível obter feixes praticamente monocromáticos com energia selecionável dentro de um amplo espectro de energia. O feixe é, por sua natureza, laminar com altura de alguns milímetros e com largura de algumas dezenas de centímetros no plano do objeto, o que o torna ideal para sistemas de imagem. As características geométricas do feixe podem também ser modificadas mediante o uso de cristais assimétricos ou de outras óticas, de modo a adaptar-se a exigências específicas (ARFELLI *et al.*, 2000).

II.4.2 Produção da Luz Síncrotron

Uma onda eletromagnética é uma perturbação que se propaga espacialmente (no vácuo), associada aos campos elétrico e magnético oscilantes no tempo. A energia transportada pela onda é a energia armazenada nesses campos. A densidade de energia (energia por unidade de volume) da onda eletromagnética pode ser determinada da seguinte forma (JACKSON, 1999):

$$\rho = \frac{1}{2} \epsilon_0 \cdot E^2 + \frac{1}{2\mu_0} \cdot B^2 \quad \text{Eq II.23}$$

onde E e B representam os módulos dos campos elétrico e magnético, respectivamente. Para uma melhor simplificação na notação, será utilizado o sistema c.g.s (gaussiano) em

que faz-se a substituição $\epsilon_o = \frac{1}{4\pi} = \frac{1}{\mu_o}$. Substituindo $c = \frac{1}{\sqrt{\mu_o \epsilon_o}}$ (velocidade da luz

no vácuo) na equação II.23, pode-se escrever a energia em função do campo elétrico, já

que $B = \frac{E}{c}$:

$$\rho = \epsilon_o . E^2 \quad \text{Eq II.24}$$

A intensidade da onda eletromagnética (I), isto é, a potência dissipada por unidade de área (J/m^2) é calculada multiplicando-se a densidade energética pela sua velocidade c :

$$I = \rho . c = c . \epsilon_o . E^2 \quad \text{Eq II.25}$$

Considerando uma partícula carregada (um elétron, por exemplo) que se move aceleradamente, pode-se mostrar que o campo elétrico tem uma dependência angular em relação à direção da aceleração a , sendo diretamente proporcional ao módulo deste vetor:

$$E = \frac{e a \text{sen}\theta}{c^2 . r} \quad \text{Eq II.26}$$

onde e é a carga do elétron e r o raio da esfera. Substituindo o módulo do campo elétrico na equação II.25, pode-se calcular a energia dissipada por unidade de tempo (ou potência) multiplicando a intensidade pela área superficial de uma esfera¹

$$P = \frac{e^2 a^2 \text{sen}^2 \theta}{c^3} \quad \text{Eq II.27}$$

A equação II.27 revela um padrão de emissão dipolar ou globular pela dependência com o quadrado do seno. Essa dependência angular pode ser eliminada por simples considerações geométricas. O sistema de coordenadas esféricas admite a seguinte relação fundamental: $x^2 + y^2 + z^2 = r^2$, que relaciona o raio da esfera com suas coordenadas cartesianas. O fato de o elétron estar no centro do sistema de coordenadas implica na igualdade dos valores quadráticos médios em cada direção, isto é:

¹ Considera-se um campo elétrico esféricamente simétrico gerado por um elétron no centro do sistema de coordenadas, isto é, no centro da esfera. Como o campo no interior de um condutor esférico é nulo, considera-se somente o campo [componente tangencial] gerado na casca esférica de espessura infinitesimal.

$\langle x^2 \rangle = \langle y^2 \rangle = \langle z^2 \rangle$; daí decorre que $\langle x^2 \rangle = \frac{1}{3} \langle x^2 + y^2 + z^2 \rangle = \frac{1}{3} \langle r^2 \rangle = \frac{r^2}{3}$. Fazendo-se uso da identidade trigonométrica fundamental, pode-se substituir a média do quadrado dos senos conforme apresentado abaixo:

$$\begin{aligned} \langle \sin^2 \theta \rangle &= \langle 1 - \cos^2 \theta \rangle = 1 - \frac{\langle x^2 \rangle}{r^2} \\ \langle \sin^2 \theta \rangle &= \frac{2}{3} \end{aligned} \quad \text{Eq II.28}$$

Substituindo este resultado na equação II.27 chega-se finalmente à fórmula de *Larmor*, que nos fornece a potência dissipada por uma carga acelerada a velocidades bem inferiores à velocidade da luz:

$$P = \frac{2}{3} \frac{e^2}{c^3} \cdot a^2 \quad \text{Eq II.29}$$

A fórmula de *Larmor* mostra que a energia liberada por uma carga acelerada depende unicamente de agentes externos (força), sendo muito pequena em relação à energia que pode ser concedida pelos aceleradores lineares. Isso pode ser constatado substituindo $a = \frac{F}{m} = \frac{E_c}{m \cdot d}$ na equação II.29 para obter a potência em função da energia cinética da partícula (E_c) e do comprimento do acelerador (d):

$$P = \frac{2}{3} \frac{e^2 \cdot c}{d^2} \cdot \left(\frac{E_c}{mc^2} \right)^2 \quad \text{Eq II.30}$$

Pela equação II.30 fica claro que a potência dissipada só será considerável quando a partícula for acelerada a uma energia próxima à sua energia de repouso (mc^2), o que não é tão simples de se conseguir devido aos efeitos relativísticos².

A situação é bem diferente quando se considera o movimento circular uniforme de uma partícula carregada, pois a perda em energia por revolução começa a não ser desprezível em relação ao ganho energético que pode ser conseguido pela aceleração

² Quanto mais próximo da velocidade da luz quisermos acelerar uma partícula, maior será o trabalho necessário. Pela expressão relativística da energia de uma partícula: $E = m \cdot c^2 / \sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}}$, percebe-se que seria necessária uma diferença de potencial infinita (trabalho infinito) para acelerá-la à velocidade da luz (Lemos, 2001).

por campos de radiofrequência. Substituindo na equação II.29 a expressão da aceleração centrípeta $a_c = \frac{v^2}{r} = \frac{p^2}{m^2 \cdot r}$, obtém-se a potência dissipada a baixas velocidades ($< 0,1c$):

$$P = \frac{8}{3} \frac{e^2 \cdot c}{r^2} \cdot \left(\frac{E_c}{mc^2} \right)^2 \quad \text{Eq II.31}$$

Novamente as perdas energéticas não são consideráveis em relação ao ganho que pode ser obtido por re-aceleração na faixa de microondas, e podem ser minimizadas aumentando-se o raio orbital. Por outro lado, se a partícula carregada for acelerada de modo que sua energia seja bem superior à sua energia de repouso, a energia cinética será dada por $E_c = c \cdot p$ e a potência dissipada será considerável, crescendo com a quarta potência da energia:

$$P = \frac{8}{3} \frac{e^2 \cdot c}{r^2} \cdot \left(\frac{E_c}{mc^2} \right)^4 \quad \text{Eq II.32}$$

Este resultado foi obtido em 1898 por Liénard (um ano depois da dedução da fórmula de *Lamor*) e constitui um marco na história da luz síncrotron por representar a primeira previsão teórica de sua emissão.

A radiação dissipada a cada volta completada por um feixe de partículas carregadas a velocidades próximas da velocidade da luz pode ser determinada considerando, agora, o momento linear relativístico ($\gamma \cdot m \cdot v$) da seguinte forma:

$$P = \frac{2}{3} \frac{e^2 \cdot c}{r^2} \cdot \gamma^4 \cdot \beta^4 \quad \text{Eq II.33}$$

onde $\beta = \frac{v}{c}$. A energia perdida a cada volta pode ser calculada multiplicando-se a

potência pelo período $\left(\frac{2\pi \cdot r}{c \cdot \beta} \right)$:

$$\Delta E = \frac{4\pi}{3} \cdot e^2 \cdot \beta^3 \cdot \gamma^4 \quad \text{Eq II.34}$$

Caso a energia dos elétrons circulantes seja bem elevada ($\beta \rightarrow 1$), a perda energética pode ser calculada em função da energia do feixe circulante, já que

$\gamma = \frac{E}{m.c^2}$. Substituindo o valor do raio clássico do elétron $\frac{e^2}{m.c^2} = 2,82.10^{-15} m$, chega-se à equação que relaciona a perda energética por volta, em função do raio da trajetória e da energia da partícula carregada.

$$\Delta E(keV) = 88,5 \frac{[E(GeV)]^4}{r(metros)} \quad Eq II.35$$

Nos primeiros síncrotrons de elétrons ($r = 1m$ e $E = 0,3 GeV$) havia uma perda média de aproximadamente 1 keV por volta – valor este pequeno mas não desprezível, se comparado ao ganho que podia ser conseguido através de reaceleração por radiofrequência. Em energias maiores as perdas tornavam-se consideráveis, explicando o porquê dos primeiros anéis de armazenamento operarem com baixas correntes de feixe para experiências de colisões de partículas, o que determinava um subaproveitamento da luz síncrotron. Com o aumento da demanda pelo uso científico da luz síncrotron, foram desenvolvidas fontes exclusivas e projetadas para se obter uma maior intensidade.

II.5 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo bem rígido, encontrado nos ossos do esqueleto dos vertebrados, onde ele é o tecido mais abundante (DÂNGELO & FATTINI, 2000). É formado por células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) e suas funções principais são:

- sustentar o corpo;
- permitir a realização de movimentos;
- proteger certos órgãos;
- realizar a produção de elementos celulares do sangue

Pode-se dividir o tecido ósseo em dois tipos: esponjoso ou reticulado ou trabecular e compacto ou denso ou cortical. Tais tipos apresentam o mesmo tipo de célula e de substância intracelular, mudando apenas entre si a disposição de seus elementos e a quantidade de espaços medulares. O tecido ósseo esponjoso e o compacto aparecem juntos na maioria dos ossos dos vertebrados (Figura II.8).

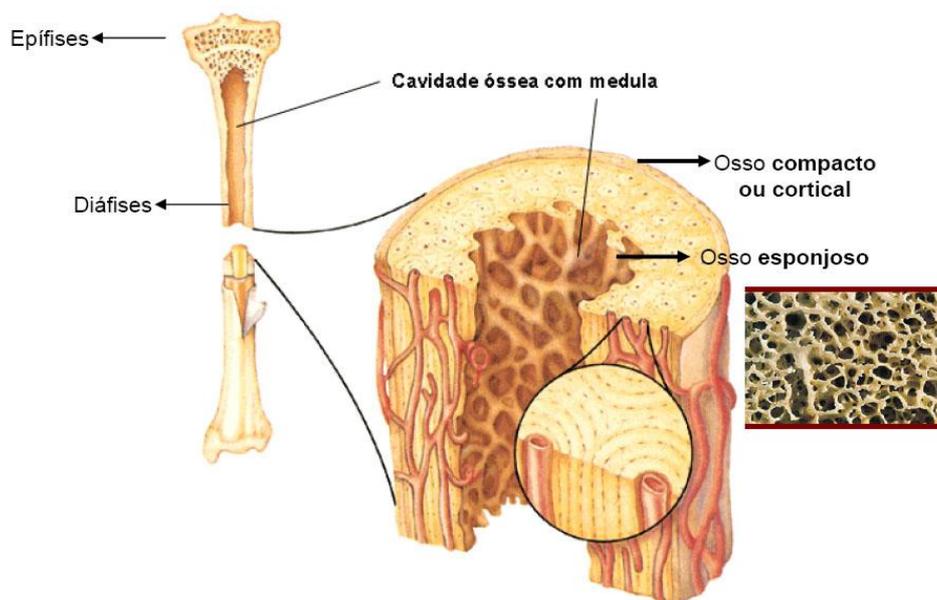


Figura II.8 – Composição do osso (Adaptado de Netter, 2004).

II.5.1 Tecido Ósseo Esponjoso

Na substância óssea esponjosa, as lamínulas ósseas mais irregulares em forma e tamanho, se arranjam de forma a deixar entre si espaços ou lacunas que se comunicam umas com as outras, chamadas de trabéculas. Comparado com o osso compacto, o osso trabecular possui uma área superficial maior, porém é menos denso, mais frágil e menos duro. Tipicamente ocorre nas extremidades de ossos longos, próximo a articulações e dentro do interior das vértebras. O osso esponjoso é altamente vascular e geralmente contém a medula óssea onde a hematopoiese, produção de células do sangue, ocorre.

II.5.2 Tecido Ósseo Compacto

Na substância óssea compacta, as lamínulas de tecido ósseo encontram-se fortemente unidas umas às outras pelas suas faces, sem que haja espaço livre interposto. Por esta razão, este tipo é mais denso e rígido. Apresenta ainda um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos: canais de Volkmann e canais de Havers. Por serem uma estrutura inervada e irrigada, os ossos têm sensibilidade, alto metabolismo e capacidade de regeneração.

II.5.3 Composição do Tecido Ósseo

O tecido ósseo possui um alto grau de rigidez e resistência à pressão. Por isso, suas principais funções estão relacionadas à proteção e à sustentação. Também funciona como alavanca e apoio para os músculos, aumentando a coordenação e a força do movimento proporcionado pela contração do tecido muscular.

Os ossos ainda são grandes armazenadores de substâncias, sobretudo de íons de cálcio e fosfato. Com o envelhecimento, o tecido adiposo também vai se acumulando dentro dos ossos longos, substituindo a medula vermelha que ali existia previamente.

A extrema rigidez do tecido ósseo é resultado da interação entre o componente orgânico e o componente mineral da matriz. A nutrição das células que se localizam dentro da matriz é feita pelos canais. No tecido ósseo, destacam-se os seguintes tipos celulares típicos:

- **Osteócitos:** os osteócitos estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea. Destas lacunas formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, tornando assim a difusão de nutrientes possível graças à comunicação entre os osteócitos. Os osteócitos têm um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea.
- **Osteoblastos:** os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Durante a alta atividade sintética, os osteoblastos destacam-se por apresentar muita basofilia (afinidade por corantes básicos). Possuem sistema de comunicação intercelular semelhante ao existente entre os osteócitos. Os osteócitos inclusive originam-se de osteoblastos, quando estes são envolvidos completamente por matriz óssea. Então, sua síntese protéica diminui e o seu citoplasma torna-se menos basófilo.
- **Osteoclastos:** os osteoclastos participam dos processos de absorção e remodelação do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. Nos osteoclastos jovens, o citoplasma apresenta uma leve basofilia

que vai progressivamente diminuindo com o amadurecimento da célula, até que o citoplasma finalmente se torna acidófilo (com afinidade por corantes ácidos). Dilatações dos osteoclastos, através da sua ação enzimática, escavam a matriz óssea, formando depressões conhecidas como lacunas de *Howship*.

- **Matriz óssea:** a matriz óssea é composta por uma parte orgânica (já mencionada anteriormente) e uma parte inorgânica cuja composição é dada basicamente por íons fosfato e cálcio formando cristais de hidroxiapatita. A matriz orgânica, quando o osso se apresenta descalcificado, cora-se com os corantes específicos do colágeno (pois ela é composta por 95% de colágeno tipo I).

II.5.4 A remodelação óssea

A remodelação óssea é um processo ativo que ocorre em todo o esqueleto, ao longo da vida, permitindo que o mesmo seja continuamente renovado. Ocorre por meio de dois ciclos intimamente acoplados (reabsorção e formação), determinados pela sequência conhecida como ARF: ativação - reabsorção - formação. Após a ativação, os osteoclastos formam a lacuna de reabsorção. Uma vez terminada essa fase, os pré-osteoblastos migram para a cavidade, diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a formação da matriz óssea. A mineralização da matriz somente ocorre vários dias após sua síntese e, durante esse processo, alguns osteoblastos serão enclausurados, transformando-se em osteócitos. A esse conjunto de células ósseas e o osso novo formado dá-se o nome de unidade metabólica óssea (do inglês, BMU), (Figura II.9) (BARON, 1996), (ERIKSEN *et al.*, 1994).



Figura II.9 – Remodelamento ósseo

As mudanças na massa óssea são causadas por um desequilíbrio da remodelação óssea, que pode ser reversível ou não. Este desequilíbrio pode ocorrer, por exemplo, devido a alterações metabólicas oriundas do recebimento de uma determinada dose de radiação pelo organismo. Quando o número de BMU's aumenta, as novas cavidades de reabsorção surgem antes que a formação no interior delas se complete, causando diminuição da massa óssea, tanto em osso cortical (aumento da porosidade) quanto em trabecular (afilamento, perfuração e perda da conectividade das trabéculas). Esse processo pode ser reversível quando cessarem as causas que o provocaram. A persistência do mesmo pode alterar a micro-arquitetura óssea e comprometer, de maneira irreversível, a função mecânica do esqueleto.

II.6 Radioterapia

A radioterapia envolve o uso de radiação ionizante para o tratamento de câncer e de algumas doenças benignas. A cirurgia, quimioterapia e radioterapia são os métodos usados para o tratamento do câncer. Frequentemente, a radiação é combinada à quimioterapia se o tumor for muito complexo ou apresentar invasão tecidual e não puder ser removido cirurgicamente. Quando possível, a cirurgia é geralmente seguida de quimioterapia, radioterapia ou uma combinação das duas. Infelizmente, em alguns casos, o câncer já está muito avançado ou é muito complexo, não apresentando resposta a nenhum tipo de tratamento. Nesses casos, a radioterapia pode ser usada como

tratamento paliativo para diminuir o tamanho do tumor ou reduzir a pressão e a dor, melhorando, assim, a qualidade de vida do paciente (BONTRAGER & LAMPIGNANO, 2003)

II.6.1 Teleterapia e Braquiterapia

Existem dois tipos de radioterapia: a **braquiterapia**, e a **teleterapia**.

A braquiterapia envolve a inserção de núclídeos com radioatividade geralmente de baixo nível dentro do corpo, próximo ao tumor ou tecido canceroso. O câncer de próstata é um candidato comum a esse tipo de tratamento.

A teleterapia é a aplicação externa de feixes de radiação, que historicamente tem sido de três tipos: unidades de raios X, unidades de cobalto-60 (ou de raios gama), e aceleradores lineares.

As unidades de cobalto-60 que emitiam raios gama de alta energia (aproximadamente 1,25 MeV) foram o padrão por muitos anos para o tratamento de tecidos profundos. Os raios X e o cobalto ainda podem ser usados em algumas localizações, mas têm sido substituídos, em grande parte, pelos aceleradores lineares, que possuem capacidade tanto para baixa energia quanto para alta, de 4 milhões de volts até 30 milhões de volts (4 a 30 MeV). Com base no tipo de tumor que está sendo tratado, pode-se usar uma combinação de braquiterapia e teleterapia.

II.6.2 Aceleradores lineares

Os aceleradores lineares podem emitir tanto raios X quanto feixes de elétrons. Ele é capaz de produzir os raios X de alta energia quando um alvo (anodo) é colocado no caminho da corrente de elétrons acelerados de alta energia, emitidos pelo filamento (catodo). A faixa de energia dos raios X emitidos é controlada pela alta voltagem aplicada ao feixe de elétrons acelerados que atinge o alvo ou anodo, de uma maneira semelhante ao tubo de raios X usado em diagnóstico.

Removendo-se o anodo, ou alvo, do feixe de elétrons, esse mesmo equipamento é capaz de produzir um feixe de elétrons de energia selecionável, dirigindo-se diretamente ao tecido que está sendo tratado. A energia desse feixe é controlada pela voltagem que é aplicada.

A incidência desses elétrons diretamente no tecido canceroso é mais eficaz no tratamento de lesões que afetam tecidos superficiais ou pouco profundos, do que os raios X ou gama de alta energia. A energia do feixe de elétrons só penetra o tecido do câncer superficial, não afetando ou danificando os tecidos saudáveis mais profundos diretamente. Entretanto, o tratamento de tumores malignos mais profundos deve ser feito com raios X de alta energia produzidos pelos aceleradores lineares ou pelos raios gama de alta energia das unidades de cobalto. Essa radiação de alta energia é distribuída diretamente no tumor maligno localizado nos tecidos mais profundos do corpo, causando o menor dano possível aos tecidos normais circundantes.

CAPÍTULO III

III MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritas as características técnicas dos equipamentos e dos experimentos e também a metodologia utilizada para a realização deste trabalho.

III.1 Animais utilizados

Neste trabalho foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, clinicamente sadios, fêmeas com idade variando entre 3 e 8 meses e peso médio de 300g. Os animais foram acondicionados em grupos de cinco animais por gaiolas, cada gaiola medindo 50 x 32 x 17 cm e mantidos em condições ambientais de temperatura (22°C) e luminosidade (ciclo 12 horas dia/12 horas noite), alimentados com ração comercial sólida sob a forma de pelotas (Nuvilab[®] CR1) e com água *ad libitum*. Manuseados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UERJ, através do processo de número CEA/248/2008, sendo o primeiro grupo eutanasiado três dias após a irradiação e o segundo grupo, 5 meses após a irradiação.

III.2 Irradiação e preparação das amostras

Os ratos foram anestesiados, via intraperitoneal, com xilasina (2 mg/kg) e cloridrato de cetamina (40 mg/kg) (Figura III.1). Após a anestesia foram imobilizados em suporte de isopor (Figura III.2) na posição de decúbito dorsal. Os animais foram submetidos a uma sessão única de radioterapia, tendo como fonte ionizante, feixes de elétrons e de fótons oriundos de um acelerador linear, modelo CLINAC 2100[®] da VARIAN, do Centro Universitário de Controle do Câncer da UERJ. Os parâmetros de cada irradiação são apresentados na Tabela III.1. Foi utilizado material equivalente ao tecido (bôlus) nas espessuras de 1,0 cm em cima da área a ser irradiada, para obter uma distribuição mais homogênea da dose. A geometria de irradiação foi de campo frontal.

Os animais foram todos irradiados com dose de 20 Gy em diferentes períodos. Este valor de dose foi usado por ser equivalente a uma dose de 45 a 60 Gy em pacientes expostos para radioterapia de câncer de mama (KRÜSE *et al.*, 2001).

Tabela III.1 – Parâmetros de irradiação

<i>Parâmetros</i>	<i>Fótons</i>	<i>Elétrons</i>
Energia	6 MeV	4 MeV
Dose	20 Gy	20 Gy
Campo	20 x 20 mm	20 x 20 mm
D.F.S	100 cm	100 cm
Taxa de dose	240 cGy/min	240 cGy/min



Figura III.1 – Processo de anestesia da cobaia antes da irradiação

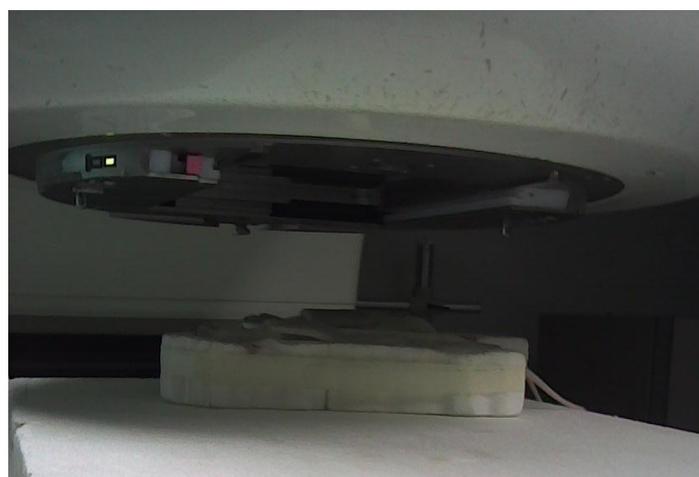


Figura III.2 – Ratos imobilizados no suporte de isopor

Os animais foram sacrificados em diferentes períodos numa câmara de CO₂ e as costelas retiradas e limpas de forma a remover os tecidos adjacentes (Figura III.3). Os sacrifícios foram divididos e nomeados da seguinte maneira: 1º sacrifício – Contr-1, Fot-1 e Elet-1 e 2º sacrifício – Contr-2, Fot-2. No grupo do 2º sacrifício não foram analisados animais irradiados com elétrons. Os períodos dos sacrifícios estão discriminados na Tabela III.2.

Tabela III.2 – Períodos de sacrifício (idade) e tempo de vida após os tratamentos dos animais

Grupo	Sacrifício	Tempo de vida pós-radioterapia
Contr-1 (n = 6)	03 meses	-
Fot-1 (n = 6)	03 meses	03 dias
Elet-1 (n = 6)	03 meses	03 dias
Contr-2 (n = 5)	08 meses	-
Fot-2 (n = 5)	08 meses	05 meses

Para as análises, foi utilizada somente uma costela de cada rato, sendo que todas da mesma posição anatômica – 6ª costela do lado esquerdo – para todos os ratos de todos os grupos (região de incidência do feixe de radiação). Para a obtenção das tomografias e posterior análise, as costelas foram divididas ainda em duas regiões: ventrais e dorsais (Figura III.4), sendo analisadas inteiras. Para a μ XRF, as costelas foram cortadas em lâminas com espessura de 0,5mm e dimensões de aproximadamente 2 x 3 mm (Figura III.5).



Figura III.3 – Costela do rato após limpeza

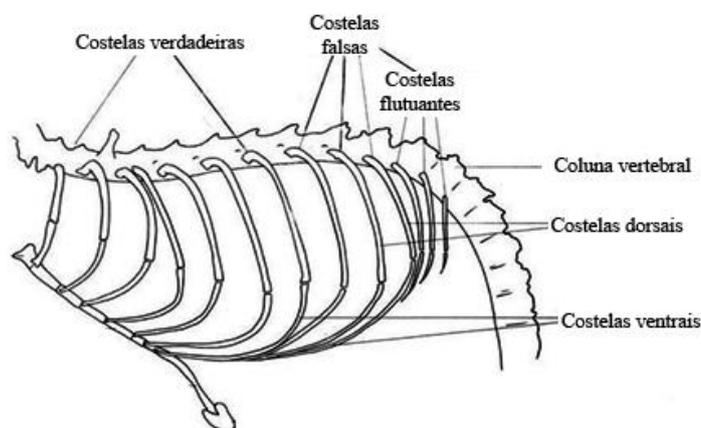


Figura III.4 – Esquema das costelas dos ratos

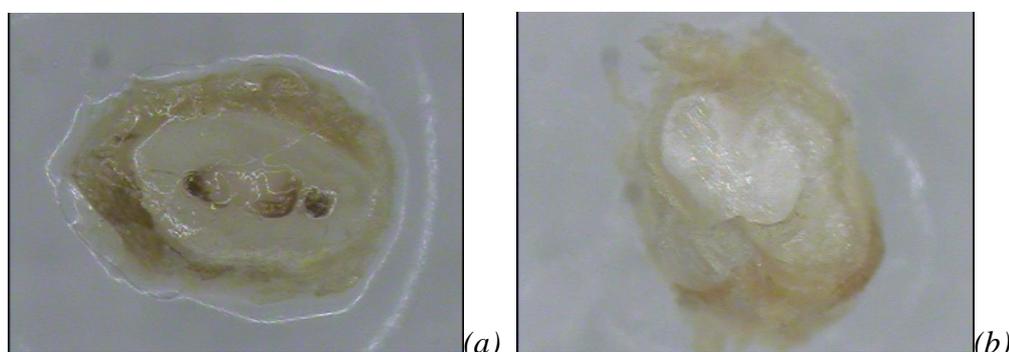


Figura III.5 – Lâminas de costelas (a) dorsal e (b) ventral

Para as análises de microtomografia foram utilizados os grupos os animais do primeiro e segundo sacrifício, e para as análises de microfluorescência foram utilizados somente animais do segundo sacrifício.

III.3 Microtomografias

III.3.1 SYRMEP

As microtomografias foram realizadas na linha SYRMEP (SYnchrotron Radiation for MEDical Physics) do laboratório de luz síncrotron ELETTRA, localizado na província de Trieste na Itália, dentro dos projetos “Dose Effects of Radiotherapeutic Procedures on Bone Structure Using Phase Contrast Micro-CT – Part I” (Projeto 2007834) e “Dose Effects of Radiotherapeutic Procedures on Bone Structure Using SR-microCT - Part II” (Projeto 20090192) sob coordenação da professora Regina Cély Barroso.

A linha de luz SYRMEP é uma das 24 linhas do ELETTRA. A divergência horizontal do feixe é de 7 mrad. Esta linha provê, a uma distância de 23 m da fonte, um feixe de raios X monocromático com área de seção máxima de $140 \times 4 \text{ mm}^2$ a 20 keV. O monocromador é baseado em um sistema de duplo cristal de Si(111) funcionando na configuração de Bragg. O conjunto de cristais é equipado com controladores de movimentos de alta precisão para realizar alinhamentos angulares precisos do segundo cristal em relação ao primeiro. O feixe de saída é paralelo ao incidente com um deslocamento vertical de 20 mm. A faixa de energia útil é de 8,5 – 35 keV ($\Delta\lambda/\lambda \cong 10^{-3}$). O fluxo típico medido na posição da amostra a 17 keV é de aproximadamente $1,6 \times 10^8$ fótons/ $\text{mm}^2 \cdot \text{s}$ com uma corrente de elétron de 300 mA quando o ELETTRA está operando a 2,0 GeV, e $5,9 \times 10^8$ fótons/ $\text{mm}^2 \cdot \text{s}$ com 140 mA a 2,4 GeV (ABRAMI *et al.*, 2005). Todas as medidas foram realizadas com o ELETTRA operando a 2,0 GeV.

A Figura III.6 representa o esquema funcional da linha de luz SYRMEP: a radiação é emitida pelos elétrons que circulam no anel quando sua trajetória é curvada pelo campo magnético do magneto curvante. A radiação assim emitida, pela tangente do anel, é policromática e a seleção da componente de energia desejada é definida pela difração sobre a superfície do cristal de silício sobre o plano cristalográfico (111). Para manter constante a direção de propagação dessa luz é escolhido um monocromador de dupla reflexão. A linha é completada por um sistema de fendas que definem as dimensões do feixe e por uma câmara de ionização que serve para medir a intensidade da radiação incidente sobre a amostra. O feixe é fixo e a aquisição das imagens é possível pelo movimento do objeto em frente ao feixe laminar.

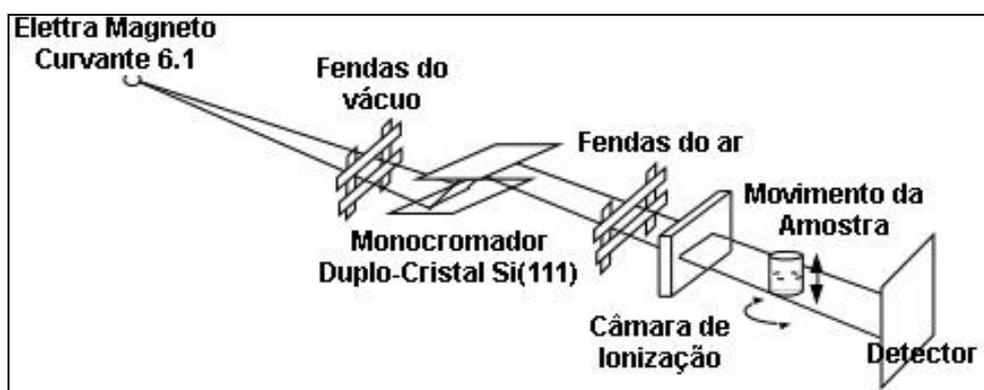


Figura III.6 – Esquema funcional da linha SYRMEP.

A estação experimental está situada a aproximadamente 23 m da fonte. A câmara de ionização (Figura III.7) colocada antes da mesa posicionadora de amostra é usada para determinar a exposição e, conseqüentemente, a dose depositada na amostra. A mesa posicionadora possui dois motores para realizar movimentos micrométricos de translação vertical e horizontal que permitem o posicionamento da amostra em relação ao feixe estacionário (TZAPHLIDOU, 2005).

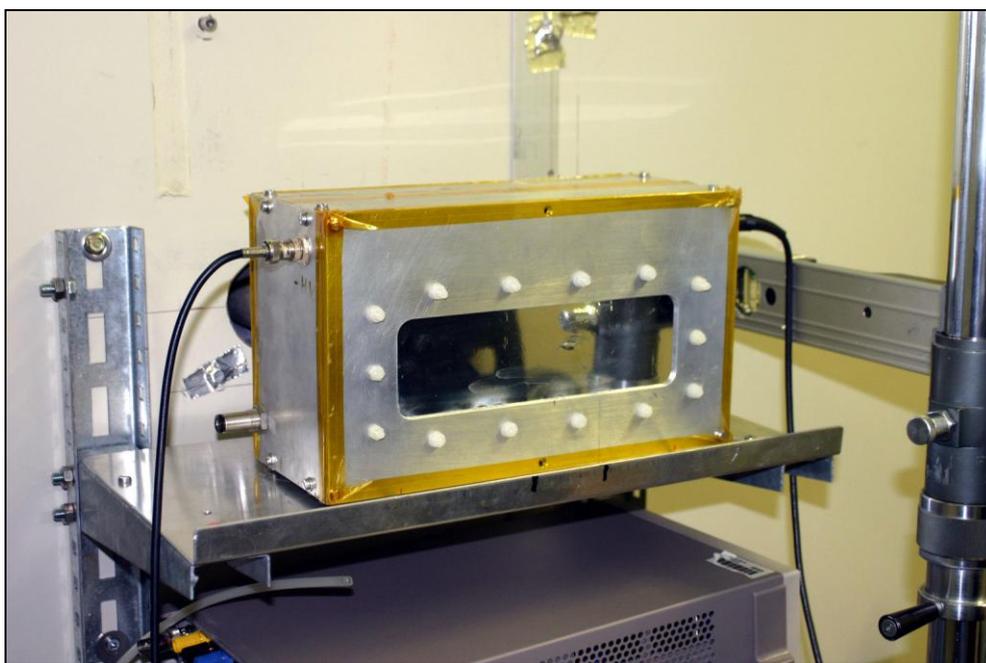


Figura III.7 – Câmara de ionização.

Neste sistema de posicionamento da amostra, um suporte rotacional com resolução de $(10^{-3})^\circ$ (Figura III.8) permite a realização das tomografias, sendo que o detector fica estacionário em frente ao feixe, enquanto o objeto gira em passos discretos em frente a ele. O sistema de detecção usado foi uma câmera CCD Hystar de 16-bits (Figura III.9), com $4008 \times 2672 \text{ pixels}^2$, tamanho de *pixel* de $4,5 \times 4,5 \mu\text{m}^2$. Este sistema pode ser posicionado a diferentes distâncias da amostra podendo variar de 0,1 a 1,0 m de forma a possibilitar a realização de imagens tanto por transmissão quanto por contraste de fase (Figura III.10) (POLACCI *et al.*, 2006; TESEI *et al.*, 2005).

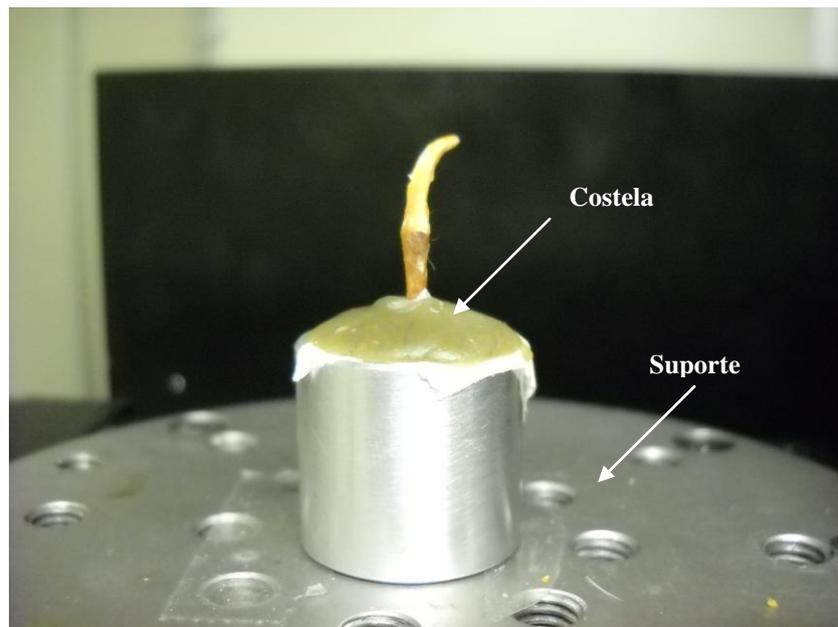


Figura III.8 – Suporte rotacional.

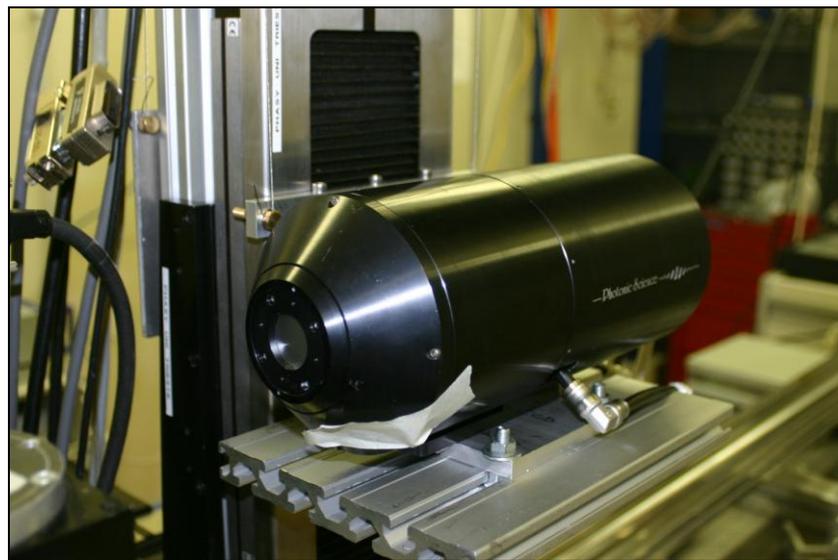


Figura III.9 – Câmera CCD 16-bits utilizada na aquisição das imagens.

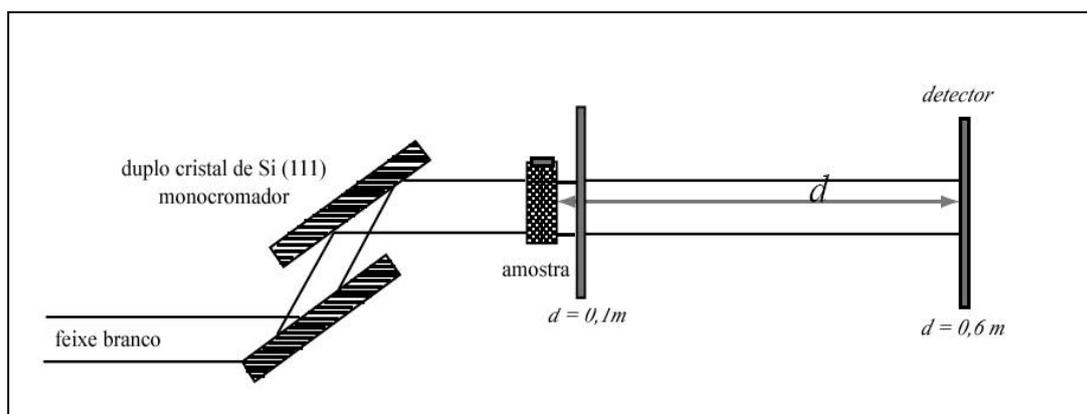


Figura III.10 – Set-up experimental usado para obtenção de imagens por transmissão e contraste de fase na linha do SYRMEP.

III.3.2 Seleção dos Parâmetros da Linha de Luz

Antes de começar as medidas tomográficas é necessário escolher os parâmetros experimentais: tamanho do feixe laminar, energia do feixe e distância amostra-detector. O sistema de controle da linha (Beamline Control System) – *mini BCS* – permite total aquisição de dados e controle remoto do tamanho do feixe e da energia escolhida (Figura III.11a).

O feixe laminar entra da sala experimental a uma distância de cerca de 23 m da fonte com uma seção de choque máxima disponível de $140 \times 4 \text{ mm}^2$ e é definido por um sistema de fendas micrométricas de tungstênio. Os sistemas de fendas são constituídos de quatro lâminas independentes chamadas Left, Right, Up e Down (Figura III.11a). O tamanho do feixe é definido pelas dimensões do sistema de fendas do vácuo e do ar que o delimitam antes de atingir a amostra. Para a realização de todas as tomografias o tamanho do feixe foi igual a $40 \times 4 \text{ mm}^2$.

A energia do feixe pode ser escolhida dentro da faixa de 8,5 a 35 keV (com resolução em energia de 0,2%) através do posicionamento remoto do duplo-cristal monocromador. O ângulo de Bragg dos dois cristais de Si(111) e o posicionamento relativo do segundo cristal em relação ao primeiro são escolhidos de modo a selecionar a energia do feixe. Os motores Berger controlam tanto o movimento dos sistemas de fendas de vácuo e de ar quanto o ângulo de Bragg do duplo-cristal monocromador. Os valores de energia em keV estão relacionados a valores para os motores Berger e AML.

Desta forma, definindo-se a energia, os motores são automaticamente acionados para os valores correspondentes (Figura III.11b).

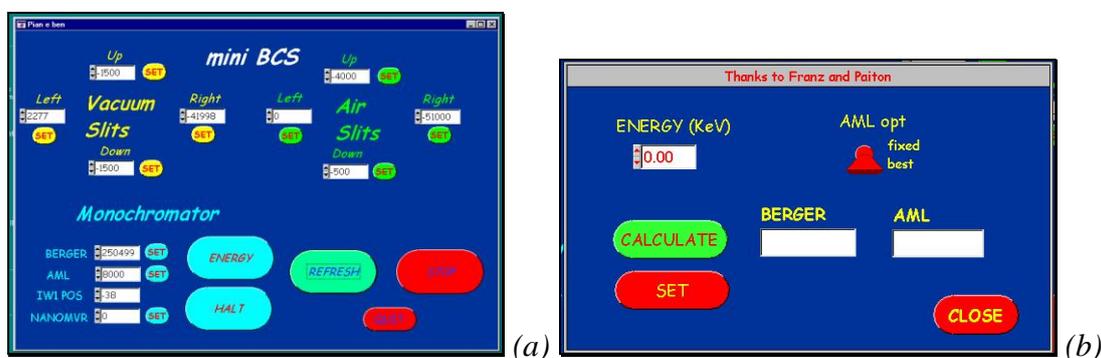


Figura III.11 – (a) Interface do sistema de controla da linha mini-BCS; (b) Submenu para cálculo automático da energia do feixe

O fluxo deve ser maximizado através da suave rotação do segundo cristal no feixe de modo a encontrar o pico de máxima intensidade da *rocking curve* do cristal. Esse movimento é feito através do motor Berger escolhendo-se valores no campo NANOMVR na Figura III.11a. Os valores de fluxo lidos pela câmara de ionização montada na sala experimental podem ser visualizados no monitor na sala de controle (Figura III.12), sendo que altos valores de corrente correspondem a altos valores de fluxo de raios X. A energia escolhida para realização de todas as tomografias foi de 15 keV (Berger = 5319 e AML = 211025). Esse valor foi escolhido de modo a maximizar a relação sinal-ruído da câmara CCD observando-se a condição de razoável transmissão do feixe através da amostra sem desconsiderar que os efeitos de fase são maiores quando a energia do feixe é menor.



Figura III.12 – Monitor indicando o fluxo do feixe de raios X lido pela câmara de ionização

Para obtenção das imagens o detector foi posicionado manualmente a 0,1 m da amostra movendo-se o detector no trilho indicado na Figura III.13.

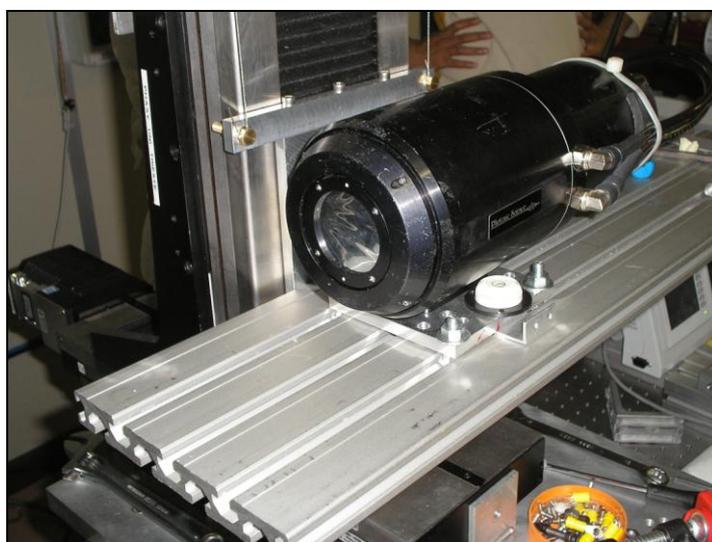


Figura III.13 – Câmera CCD posicionada no trilho para seleção da distância amostra-detector

As amostras foram centralizadas no suporte de modo a utilizar a totalidade do campo de vista da câmera CCD. O posicionamento da amostra e do detector é feito pelos motores *Newport* da linha e realizado remotamente através da interface *Newport* (Figura III.14). Para fazer esse alinhamento uma amostra padrão em forma de agulha é usada.

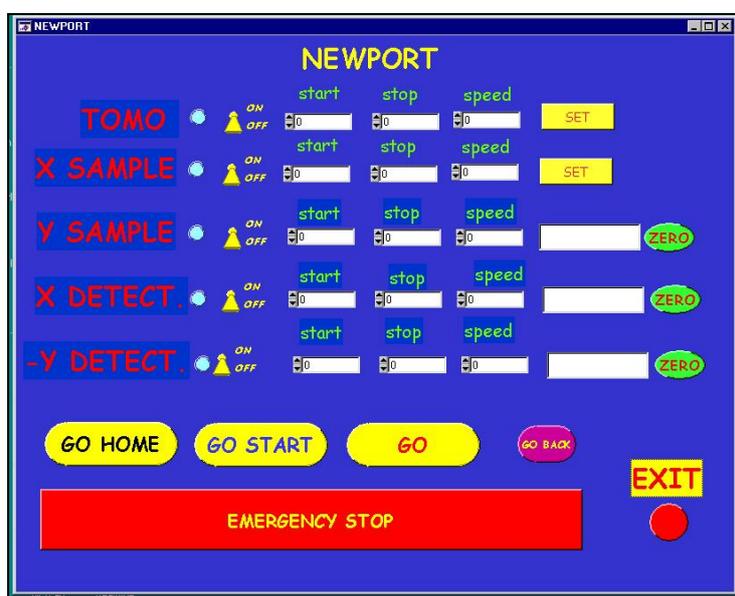


Figura III.14 –Interface do programa Newport para o alinhamento do centro da amostra e do detector

III.3.3 Aquisição das Tomografias

A amostra é rotacionada dentro do feixe monocromático incidente em um intervalo angular entre 0 e 180 graus. Para cada passo angular uma radiografia planar é gravada pela câmera CCD. Todo o controle dos parâmetros da câmera CCD para aquisição das imagens e a sincronização com os motores *Newport* da linha são realizados pelo programa *Image Pro Plus v.5.1*. Os parâmetros da câmera a serem definidos são: área de captura da imagem, tempo de exposição para cada aquisição e *binning* (Figura III.15a e Figura III.15b).

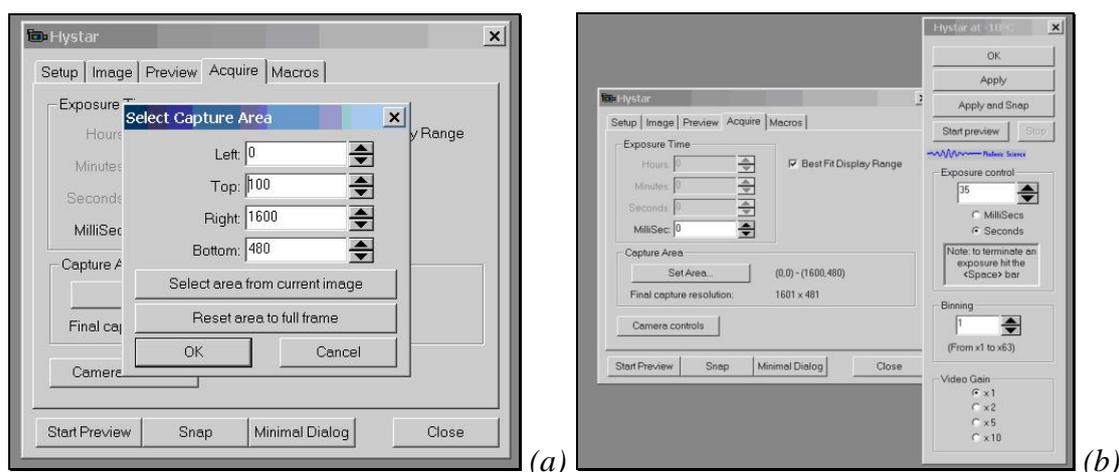


Figura III.15 – Interface do programa Image Pro Plus: (a) Submenu para seleção da área de captura da imagem. (b) Submenu para seleção do tempo de aquisição e binning da imagem.

No submenu *Image* (Figura III.16a) pode-se selecionar o número de imagens que se deseja obter: apenas uma imagem para o alinhamento da amostra e do detector ou uma série de imagens para a realização das medidas tomográficas. Uma macro permite fazer girar a amostra de um dado passo angular depois de cada aquisição (Figura III.16b). Após cada aquisição, o arquivo é salvo na destinação definida.

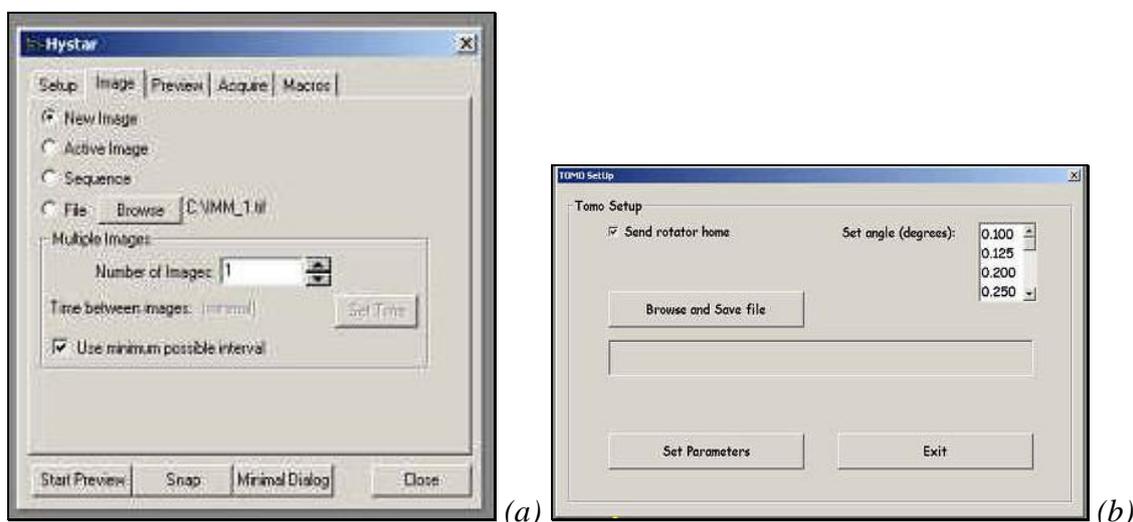


Figura III.16 – (a) Submenu para seleção do número de imagens a serem adquiridas. (b) Submenu para seleção do passo angular e destinação dos arquivos gerados.

Para realização das tomografias foram obtidas 900 imagens ou projeções, ou seja, com passo angular igual de $0,2^\circ$. O tempo de aquisição para cada imagem foi de cerca de 2 segundos. O tempo de aquisição foi otimizado para cada amostra em função

do decaimento do fluxo do feixe, mantendo-se fixa a intensidade medida no centro da amostra.

Todas as imagens obtidas serão normalizadas a partir da relação:

$$I_{\text{Normalizada}} = \frac{I_{\text{Amostra}} - I_{\text{Dark}}}{I_{\text{Flat}} - I_{\text{Dark}}} \quad \text{Eq III.1}$$

Onde: I_{Amostra} é a imagem da amostra capturada pela câmera CCD após definidos todos os parâmetros experimentais;

I_{Dark} é a imagem capturada pela câmera CCD com o *shutter* fechado (sem feixe);

I_{Flat} é a imagem capturada pela câmera CCD com o *shutter* aberto e sem a amostra na frente do feixe.

A Figura III.17 mostra um exemplo de cada uma dessas imagens obtidas para uma amostra de osso humano (NOGUEIRA, 2008). I_{Dark} e I_{Flat} são imagens médias calculadas a partir de um conjunto de 5 imagens obtidas antes e depois da aquisição de todas as projeções.

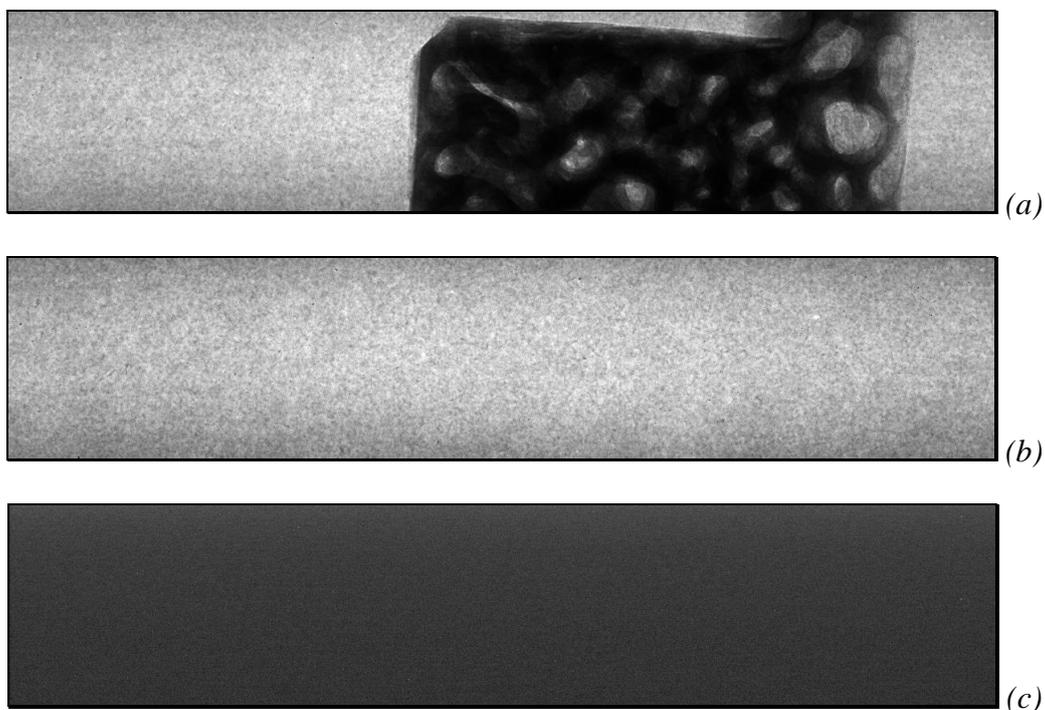


Figura III.17 – (a) Imagem da amostra. (b) Imagem flat. (c) Imagem dark (NOGUEIRA, 2008)

III.3.4 Reconstrução das Imagens

O procedimento de reconstrução das imagens foi desenvolvido pelo grupo SYRMEP no IDL (Interactive Data Language) que é um ambiente computacional completo para análise interativa e visualização de dados. O IDL integra uma poderosa linguagem com numerosas técnicas de análise matemática e visualização gráfica. O projeto IDL *SYRMEP_TOMO_PROJECT*, disponível na linha de luz, elabora as projeções através do seguinte procedimento de reconstrução usando retroprojeção filtrada:

- Mostrar uma única projeção normalizada. Para cada projeção um mapa de intensidades é gravado no plano *xy* do detector.
- Selecionar interativamente um *slice* do qual se deseja construir o sinograma (Figura III.18a).
- Selecionar o filtro ao qual os *slices* serão submetidos (*ramlak*, *shepp_logan*, *kernel width*, *rem ring*, *rem zinger*). O filtro *Shepp-Logan* foi usado para todas as imagens.
- Escolher na imagem do sinograma a largura do *slice* a ser reconstruído definindo os limites esquerdo e direito (*Crop Left Right*) no sinograma de modo a selecionar a região que realmente contém os dados (Figura III.18b).
- Otimizar o valor para o centro de rotação de modo a obter um sinograma melhor centrado em relação ao eixo de rotação minimizando assim, o aparecimento de artefatos nos *slices* reconstruídos.
- Finalmente, depois de otimizados os parâmetros tomográficos, todos os sinogramas podem ser criados e os *slices* podem ser reconstruídos. Todos os *slices* foram convertidos de 16-bits para 8-bits para maior rapidez na reconstrução e tratamento das imagens. O tempo total para reconstrução das imagens 2D foi de cerca de 2 horas.
- Os *slices* reconstruídos são então tratados por um processo de “renderização” para a reconstrução 3D onde os *slices* 2D são visualizados como uma pilha (*Stack*) (Figura III.18c).

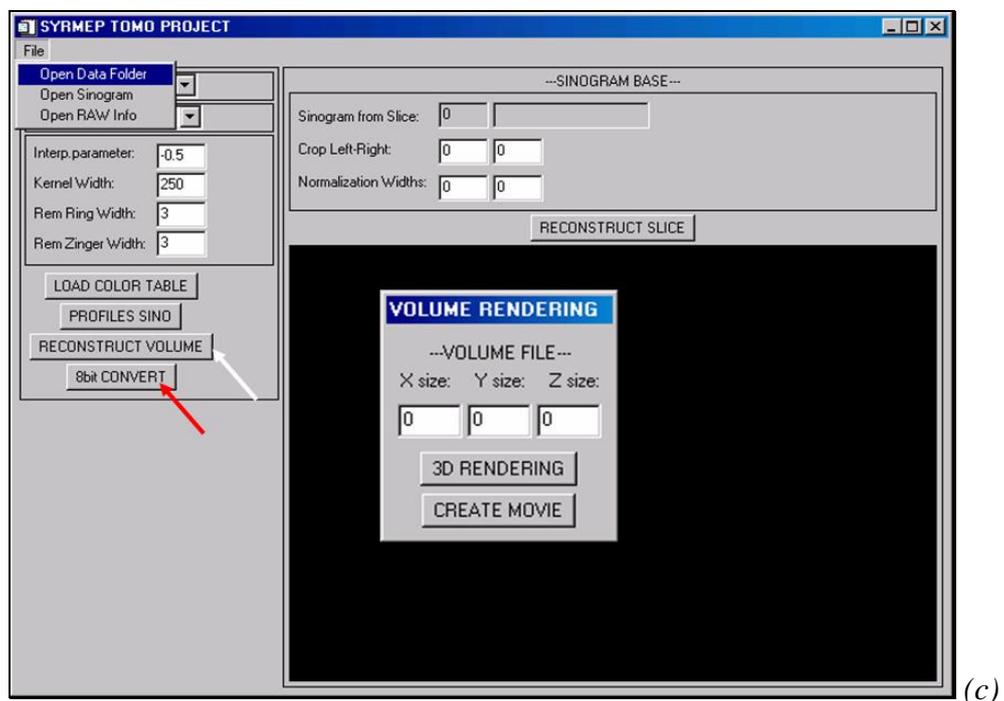
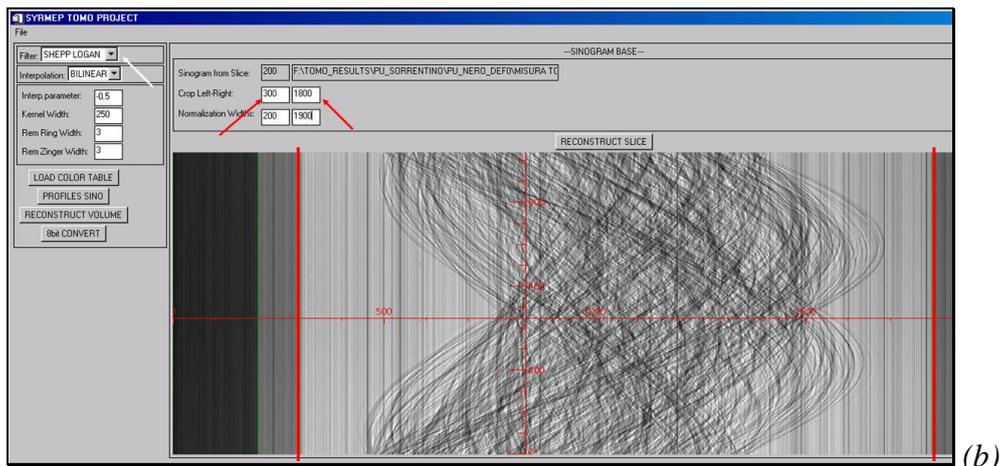
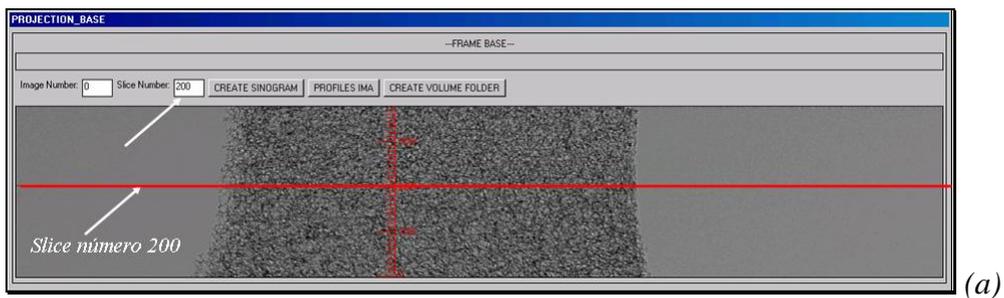


Figura III.18 – (a) Janela do programa de reconstrução mostrando um exemplo de projeção e a escolha do slice na imagem. (b) Sinograma do slice escolhido definindo os limites esquerdo e direito (setas vermelhas) e o filtro usado (pela seta branca). (c) Janela para a reconstrução do volume (seta branca) e a conversão das imagens para 8-bit (seta vermelha).

III.3.5 Quantificação das Amostras de Osso

O conjunto de imagens de cada tomografia foi agrupado em *stacks* (pilhas) contendo todo o grupo de *slices* num total de 581 *slices*. Cada *stack* foi recortado em dimensões de 400 x 400 *pixels*, o que garantiu que todas as amostras pudessem estar contidas dentro do volume escolhido (400 x 400 x 581). Este volume é salvo num arquivo no formato *.raw* contendo todos os *slices* daquela amostra, gerando desta forma um volume com as dimensões definidas.

A partir destas imagens, fez-se um tratamento, de forma a normalizar o contraste entre todos os *slices* usando o programa ImageJ³.

Após esta etapa, realizou-se uma segmentação das imagens por binarização. Para a segmentação, deve-se escolher um valor de limiar (*threshold*), acima do qual, todos os *pixels* serão considerados osso, e abaixo do qual, todos os *pixels* serão considerados não-osso. O valor de *threshold* é selecionado de forma a garantir que aquilo que é osso, seja computado como osso, e aquilo que não é osso, como vazio, e ainda que não haja perda de informação ao se selecionar um valor de *threshold*. A Figura III.19 mostra o processo de binarização de uma imagem usando o programa ImageJ[®].

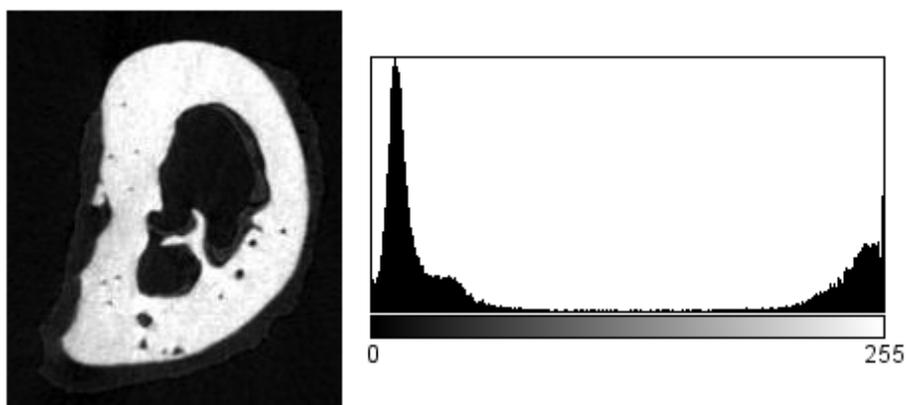


Figura III.19 – Processo de binarização da imagem de uma amostra usando o programa ImageJ[®].

Após a segmentação da imagem, ela passa a apresentar somente duas informações: o que é osso e o que não é osso, ou seja, os *pixels* brancos representam o osso, e os *pixels* pretos representam o que não é osso – este processo também é

³ ImageJ – Disponível gratuitamente em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

chamado de binarização. É importante ressaltar que existe uma dependência entre o nível de *threshold* e a quantificação dos parâmetros histomorfométricos (DIEDERICHS *et al.*, 2009). Trabalhos como de HARA *et al.* (2002) mostraram que a variação nos parâmetros histomorfométricos são desprezíveis (< 3% para variações de um ponto no nível de *threshold*), utilizando um sistema de microtomografia com resolução de 22 μ m e raios X policromáticos. Nesta tese foram testadas as dependências de BV/TV e BS/BV com o valor de limiar (*threshold*) e as variações foram desprezíveis (<1% para variações de um ponto no nível de *threshold*). Vale ressaltar que neste trabalho foi utilizado raio x monocromático e a resolução do sistema foi de 9 μ m.

Neste trabalho, o valor de *threshold* foi escolhido a partir da segmentação automática do software ImageJ[®] (RIDDLER *et al.*, 1978) baseada no algoritmo *isodata* iterativo, garantindo uma segmentação mais fidedigna das imagens, sem interferência humana.

Após tratamento das imagens, foi realizada a quantificação histomorfométrica 3D utilizando um software desenvolvido no laboratório de Física Médica da UERJ, com base no algoritmo de Feldkamp (OLIVEIRA & LOPES, 2004). Os índices histomorfométricos avaliados foram: razão volume ósseo e volume total da amostra (BV/TV); a razão entre superfície óssea e volume ósseo (BS/BV); a separação média entre as trabéculas (Tb.Sp); a densidade de trabéculas (Tb.N) e a espessura média das trabéculas (Tb.Th).

III.4 Microfluorescência de raios X (μ XRF)

III.4.1 Linha de luz síncrotron

As medidas de microfluorescência de raios X foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP, Brasil, na linha D09B-XRF. A linha de XRF destina-se à análise da composição química multielementar ($Z \geq 13$), em aplicações científicas de determinação de elementos traços em ciências ambientais, biológicas e de materiais, perfil de profundidade química de filmes finos e mapeamento químico. As principais características da linha são listadas a seguir:

✚ Campo magnético do dipolo D09B: 1,65 T;

- ✚ Anel de armazenamento de elétrons: 93,2 m de perímetro, e 30 m de diâmetro;
- ✚ Energia do elétron no anel de armazenamento: 1,37 GeV ($i = 100$ mA);
- ✚ Fluxo de fótons a 8 keV e área de 20 mm²: $4,2 \times 10^9$ fótons/s;
- ✚ Feixe branco (policromático dentro da faixa de raios X) ou seleção de energia entre 4 e 23 keV;
- ✚ Cristal monocromador de silício (111)
- ✚ Detector semiconductor de Si(Li), com resolução de 165 eV a 5,9 keV, e de HPGe, com resolução de 150 eV a 5,9 keV;
- ✚ Sistema semi-automático de posicionamento da amostra, com movimentos tridimensionais.

Na estação experimental de XRF, para a detecção dos raios X fluorescentes é utilizado um espectrômetro de alta resolução, baseado em um detector semiconductor de Si(Li), com janela de berílio de 8 μm de espessura, uma área ativa de 30 mm², acoplada a um módulo amplificador e placa analisadora multicanal

Para a análise de amostras pela técnica de microfluorescência de raios X (μXRF) utiliza-se uma mesa para o alinhamento do capilar capaz de fornecer reprodutibilidade e alta resolução angular. (MELO JÚNIOR, 2007)

Quatro estágios de translação linear foram mecanicamente acoplados com lâminas flexíveis para fornecer translações e rotações perpendiculares ao eixo longitudinal do capilar.

O microfeixe é gerado com um fino capilar cônico com 20 μm de diâmetro na saída. A estação de μXRF inclui além do detector dispersivo, um microscópio ótico com zoom motorizado e um conjunto de estágios X,Y,Z para o posicionamento da amostra. Todos estes estágios são completamente controlados remotamente.

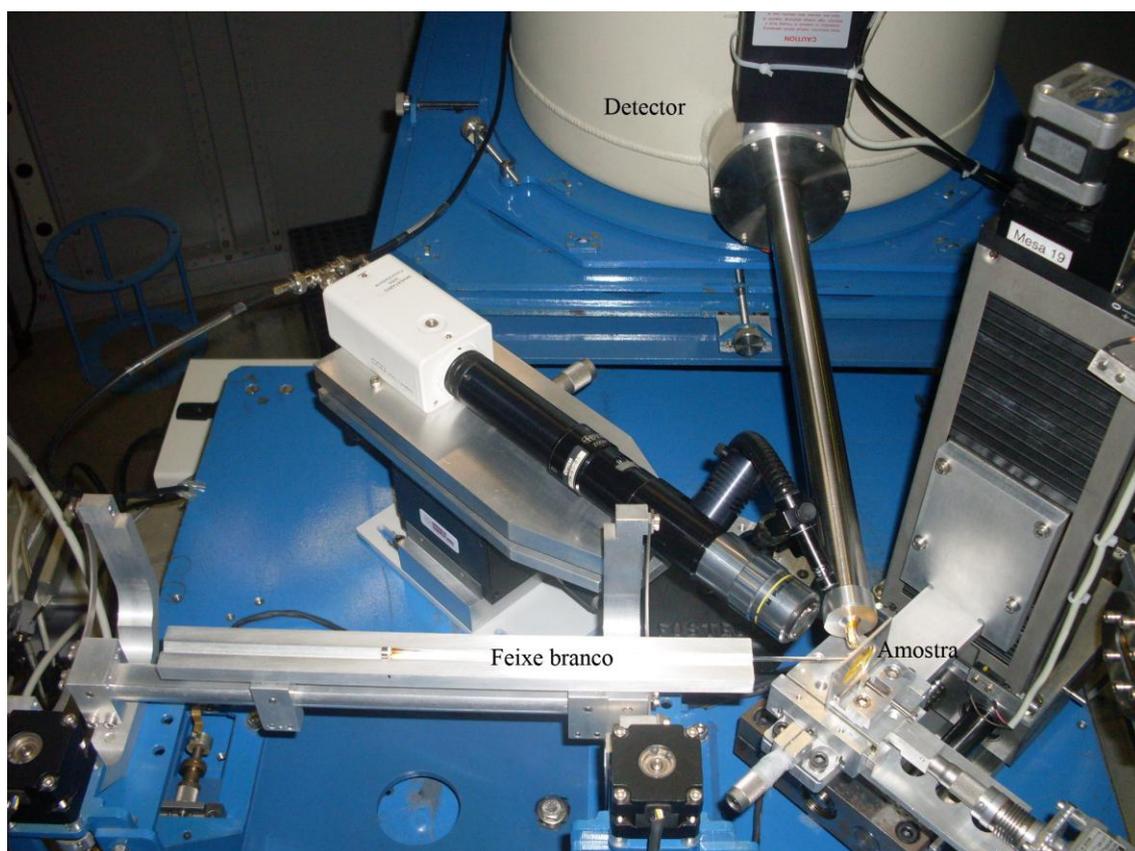


Figura III.20 – Setup da linha de microfluorescência

Para aquisição dos espectros para μ XRF, utilizou-se um feixe branco de radiação para excitar as amostras, com dimensões de $30 \times 30 \mu\text{m}$, ou seja, varrendo a amostra a cada $30\mu\text{m}$, o que corresponde a um pixel no mapeamento, nas direções vertical e horizontal. As amostras foram presas em plástico filme, sendo este último preso a um suporte vazado de alumínio.

O suporte é posicionado a 45° em relação ao detector e ao feixe incidente e os raios X produzidos são detectados por um detector de Si(Li). Os espectros foram analisados no programa Axil (QXAS, 1995), e os mapas bidimensionais foram obtidos após normalização das intensidades dos raios X característicos pelo valor da câmara de ionização, que mede a intensidade do feixe incidente na amostra (que é função da corrente do anel de armazenamento).

Como os cortes das costelas eram de dimensões bem reduzidas (aprox. $2 \times 3 \text{ mm}$) e o tamanho do feixe de $30 \times 30 \mu\text{m}$, obtiveram-se matrizes de aproximadamente 25×35 pixels (considerando que a amostra não foi varrida por inteira para análise) num

total de cerca de 900 espectros, dependendo do tamanho da amostra, o que despendeu aproximadamente 2,5 horas para cada amostra.

Os elementos analisados foram: potássio, cálcio, zinco e estrôncio. Estes elementos foram escolhidos por serem os de maiores intensidades presentes nos ossos.

Para o ajuste dos espectros dos raios X característicos, determinação dos elementos e suas respectivas intensidades fluorescentes, foi utilizado o programa Quantitative X-Ray Analysis Software (QXAS) fornecido pela International Atomic Energy Agency (IAEA) (BERNASCONI, 1995).

CAPÍTULO IV

IV RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados e as discussões da análise estrutural (μ TC) e elementar (μ XRF) das amostras de costelas dos ratos irradiados e de controle.

Os resultados deste trabalho foram divididos em três partes: a primeira parte refere-se às medidas histomorfométricas por μ TC das costelas dos ratos submetidos a irradiação por fótons e elétrons, tendo sido sacrificados três dias após a irradiação, com três meses de idade (1º sacrifício). A segunda parte refere-se também às medidas histomorfométricas por μ TC das costelas dos ratos, porém somente aqueles submetidos a irradiação por fótons, tendo sido sacrificados 5 meses após a irradiação, e idade de 8 meses (2º sacrifício). E por fim, a terceira parte refere-se à análise por μ XRF das costelas dos ratos também submetidos a irradiação com fótons, sacrificados 5 meses após a irradiação e com 8 meses de idade.

Vale ressaltar a qualidade das imagens tomográficas obtidas com o uso da radiação síncrotron. A resolução e a quantidade de detalhes presentes nas imagens permitem análises de detalhes da ordem de dezenas de micrometros e conseqüentemente uma quantificação precisa. A Figura IV.1 mostra *slices* em diferentes profundidades de uma amostra irradiada do 2º sacrifício.

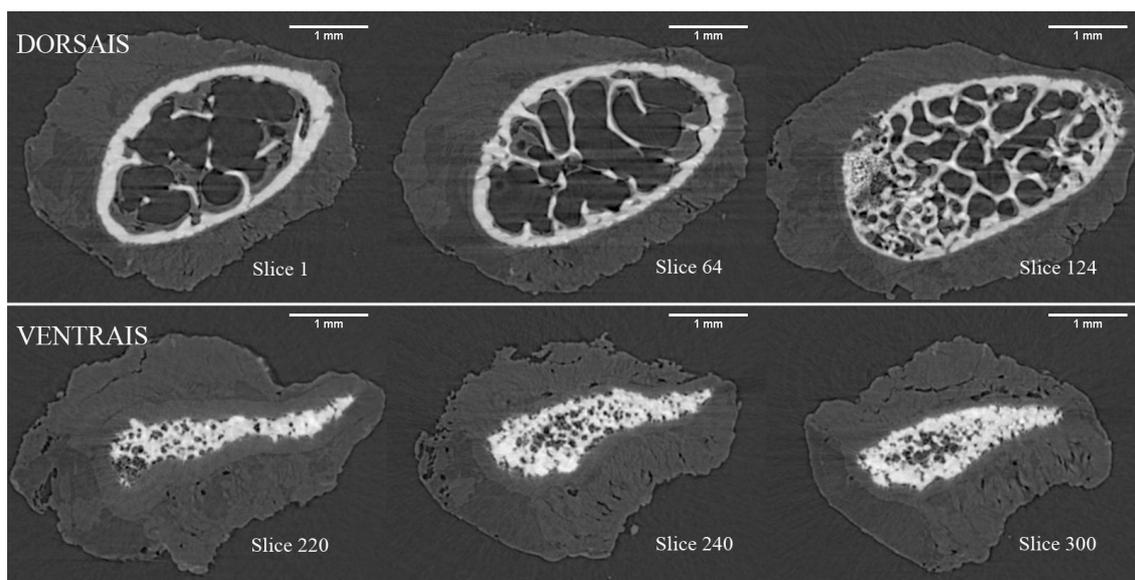


Figura IV.1 – Slices de diferentes profundidades da região de conexão entre as partes dorsal e ventral

Nota-se claramente a presença de tecido mole remanescente junto ao osso. A amostra apresentada na Figura IV.1 engloba a região de conexão entre a região dorsal e ventral. Quanto mais próxima da região de conexão, a região dorsal passa a apresentar uma característica mais trabecular, conforme visto no *slice* 124. Para quantificação, foram escolhidas regiões similares dentre as amostras, cerca de 200 *slices* a partir da região de conexão, tanto para as regiões dorsais quanto ventrais (Figura IV.2). Desta maneira garante-se que não há muita variação nas características de cada região como, por exemplo, o aumento da presença de trabéculas na região dorsal próxima à conexão dorsal-ventral. A Figura IV.3 apresenta diferentes posições da reconstrução 3D da amostra apresentada na Figura IV.1.

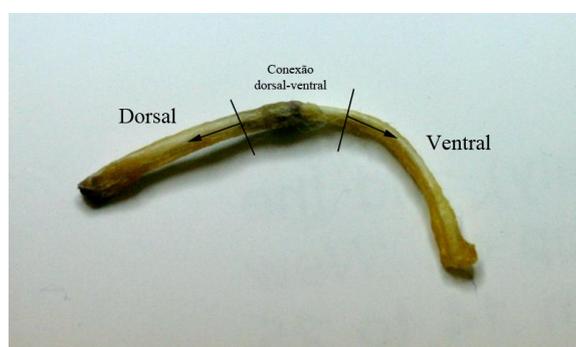


Figura IV.2 – Regiões analisadas das costelas

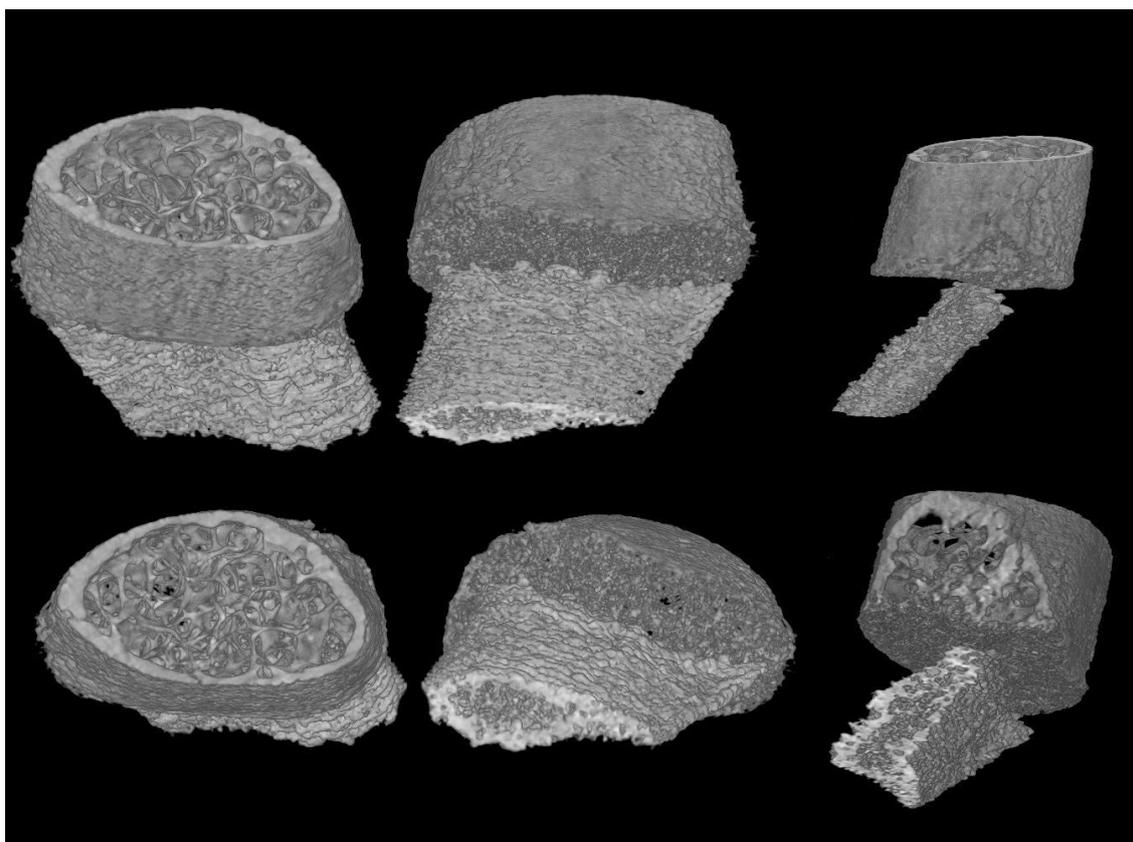


Figura IV.3 – Imagens 3D de diferentes ângulos da costela

As imagens 3D apresentadas em diferentes ângulos permitem visualizar detalhes de diversas regiões da amostra, além de cortes sagitais e coronais. É a partir das imagens tridimensionais que são feitas as quantificações histomorfométricas, apresentadas a seguir.

A segmentação é de grande importância quando se trata de quantificação. Trabalhos como o de HARA *et al.* (2002) mostram a importância e o quanto devemos nos preocupar com a escolha do valor de *threshold* quando se trata de quantificação histomorfométrica. Porém, em seu trabalho, HARA *et al.* (2002) quantificam a dependência do *threshold* na análise histomorfométrica por tomografia computadorizada com raios X policromáticos. No entanto, quando as imagens de tomografia são obtidas com feixes monocromáticos e de alta coerência espacial, somado ao alto coeficiente de atenuação do osso, a escolha do nível de *threshold* para a segmentação das imagens já não é tão crítica quanto no caso de feixes policromáticos. Na Figura IV.4 nota-se a presença de tecido não-ósseo anexo ao osso. Este tecido é praticamente invisível a olho nu, e mesmo após a limpeza física do osso, parte dele

ainda permaneceu. Através da segmentação é possível remover facilmente este tecido anexo ao osso, sem comprometer detalhes da estrutura óssea, conforme pode-se notar na sequência de imagens da Figura IV.4. Na Figura IV.4c nota-se que não há mais a presença do tecido mole anexo ao osso e as estruturas ósseas permanecem inalteradas.

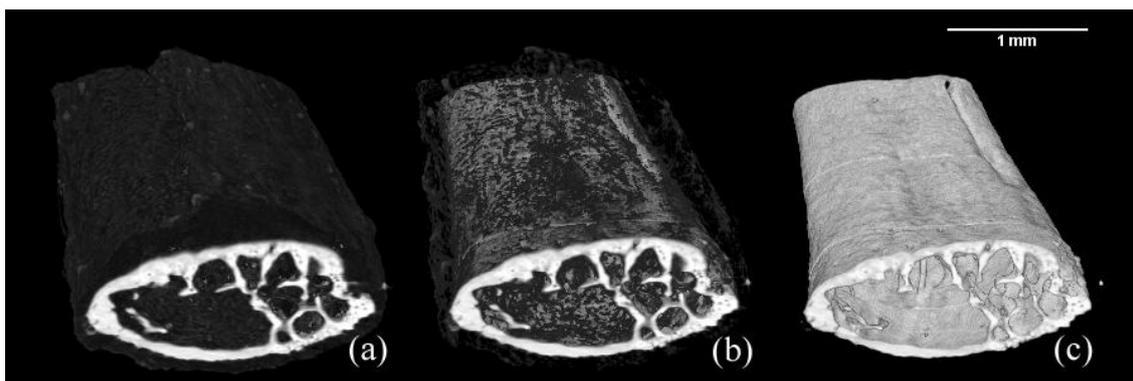


Figura IV.4 – Imagens 3D com threshold de (a) 50; (b) 85 e (c) 120.

IV.1 Fótons x Elétrons x Controle (μ TC) – 1º sacrifício

IV.1.1 Imagens

A seguir são apresentadas algumas imagens 3D e 2D de cada grupo analisado. No texto, onde se lê fótons, entenda-se por grupo irradiado por fótons, e onde se lê elétrons, entenda-se por grupo irradiado por elétrons.

A análise também foi dividida em duas regiões da costela, tendo em vista as diferentes características estruturais das mesmas. A região dorsal, como já visto, apresenta uma característica mais compacta, predominantemente cortical. Já a região ventral possui grande porosidade, assemelhando-se a trabéculas presentes no interior da maioria dos ossos. Na região dorsal foram analisados os parâmetros histomorfométricos primários, BV/TV e BS/BV, tendo em vista a ausência de trabéculas. Já na região ventral, foram analisados, além dos parâmetros primários, também os secundários Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp.

As imagens são apresentadas através de reconstruções 3D e fatias 2D do centro de cada amostra em questão. A Figura IV.5 mostra imagens de costelas de controle, fótons e elétrons da região dorsal dos animais do primeiro sacrifício, ou seja, aquele

grupo cujo sacrifício ocorreu 3 dias após o procedimento de irradiação do grupo irradiado.

As imagens tridimensionais apresentadas representam exatamente a região da qual foi feita a quantificação histomorfométrica. As regiões escolhidas foram próximas ao meio da amostra, tanto para dorsal quanto para ventral.

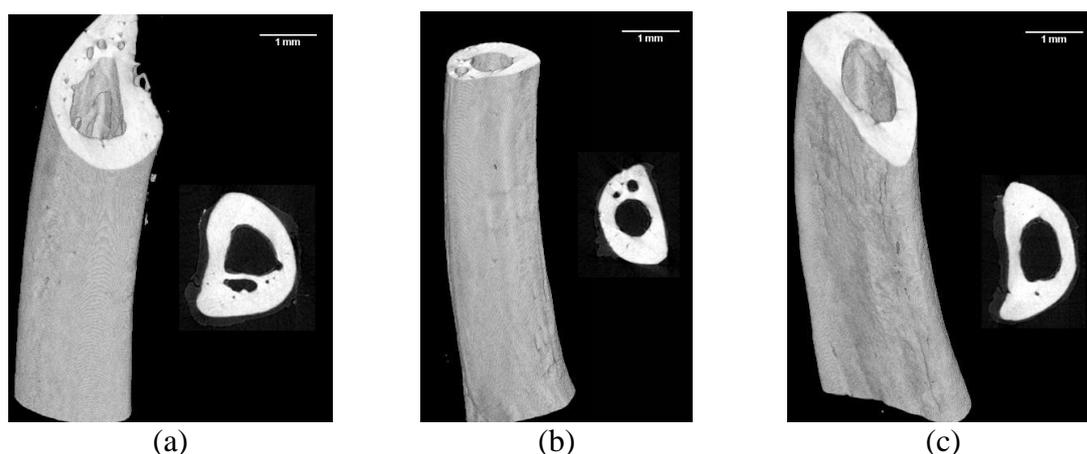


Figura IV.5 – Imagens 3D e 2D de costelas dorsais dos grupos (a) Contr-1, (b) Fot-1 e (c) Elet-1

A Figura IV.6 apresenta as costelas ventrais, das amostras de controle, de fótons e de elétrons. Como mencionado anteriormente, notam-se que as costelas ventrais apresentam em sua estrutura uma característica porosa (esponjosa) como pode ser visto na Figura IV.6.

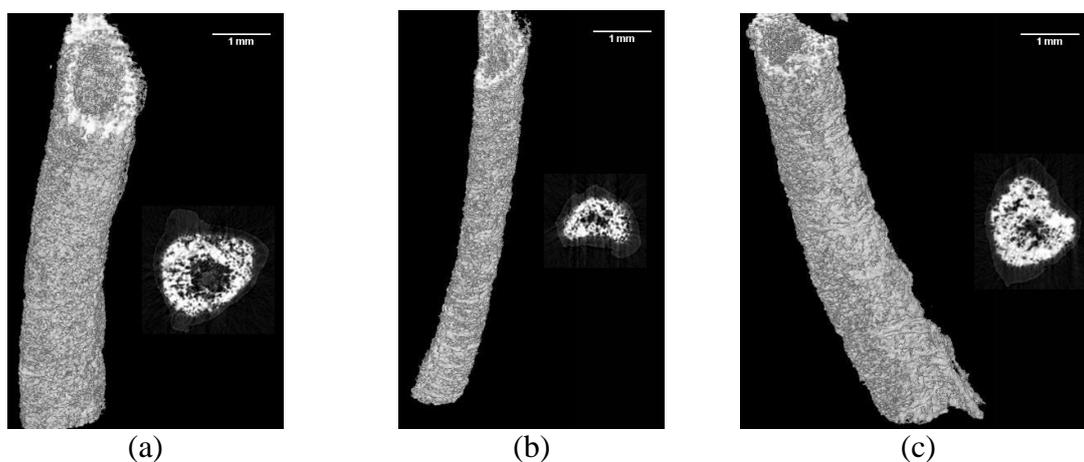


Figura IV.6 – Imagens 3D e 2D de costelas ventrais dos grupos (a) Contr-1, (b) Fot-1 e (c) Elet-1

Outras imagens de microtomografia encontram-se no anexo A.

IV.1.2 Quantificação histomorfométrica

A quantificação histomorfométrica a partir das imagens 3D por microtomografia computadorizada foi realizada em todas as amostras de controle (N = 6), fótons (N = 6) e elétrons (N = 6), nas regiões dorsal e ventral, separadamente. Nesta primeira parte, as imagens 3D continham 500 *slices* cada. Nas Tabela IV.1 e Tabela IV.2, os resultados da quantificação histomorfométrica desta primeira parte são apresentados.

Tabela IV.1 – Valores histomorfométricos das costelas dorsais.

COSTELAS DORSAIS		
Grupo	BV/TV (%)	BS/BV (mm ⁻¹)
Contr-1 (N = 6)	72,05 ± 1,26	8,39 ± 0,225
Elet-1 (N = 6)	75,25 ± 4,58	8,52 ± 0,669
Fot-1 (N = 6)	78,58 ± 3,27	8,62 ± 1,037

Tabela IV.2 – Valores histomorfométricos das costelas ventrais.

COSTELAS VENTRAIS					
Grupo	BV/TV (%)	BS/BV (mm ⁻¹)	Tb.Th (µm)	Tb.N (mm ⁻¹)	Tb.Sp (µm)
Contr-1 (N = 6)	76,44 ± 8,12	33,53 ± 1,32	59,74 ± 2,41	12,76 ± 0,84	18,93 ± 7,29
Elet-1 (N = 6)	76,87 ± 7,31	30,40 ± 3,19	66,48 ± 6,50	11,57 ± 0,22	19,99 ± 6,25
Fot-1 (N = 6)	80,62 ± 7,65	40,19 ± 3,37	50,09 ± 3,97	16,11 ± 1,06	12,25 ± 5,02

A partir da análise dos gráficos torna-se mais fácil notar possíveis diferenças entre grupos de controle, irradiados com elétrons e irradiados com fótons. Os gráficos a seguir representam os dados das Tabela IV.1 e Tabela IV.2.

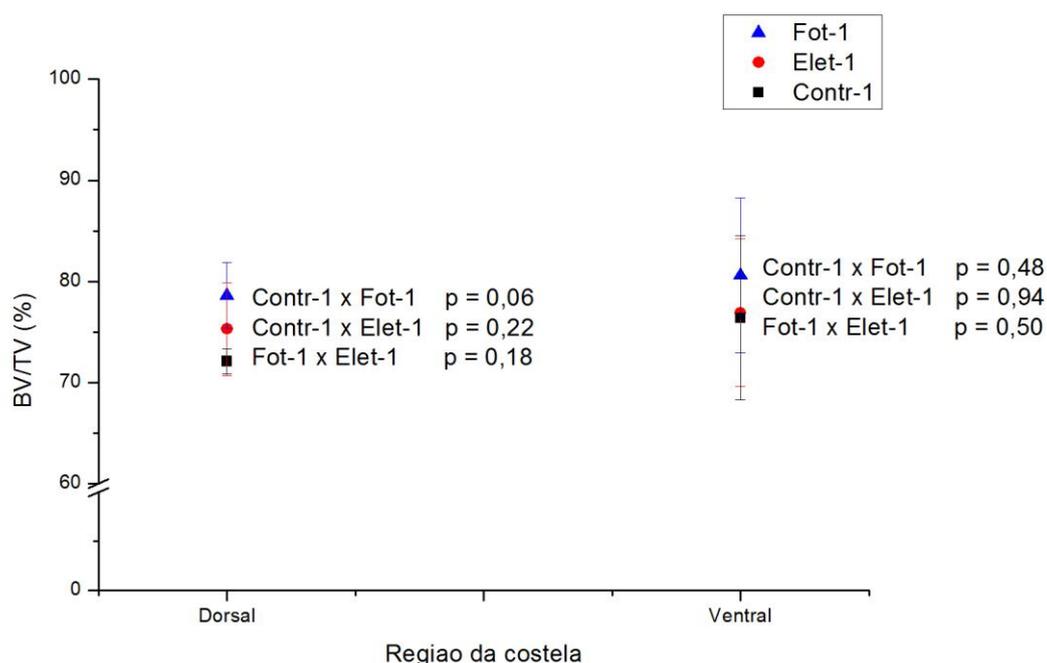


Figura IV.7 – Gráfico de BV/TV referente ao 1º sacrifício

O desvio padrão da amostra de controle é expresso em forma de barras verticais. A análise da Figura IV.7, em conjunto com o teste *t de Student* permitem-nos algumas conclusões: tanto a região dorsal quanto a região ventral, não sofreram alterações significativas no índice BV/TV. Estudos revelam que a densidade mineral óssea não apresenta variações significativas após irradiação (CHEN *et al.*, 2002) e que o conteúdo mineral ósseo cortical não está associado a um aumento na fragilidade óssea pós-irradiação (NYARUBA *et al.*, 1998). Como a região dorsal das costelas são predominantemente de característica cortical, não era de se esperar mudanças em BV/TV devido à irradiações dentro do curto intervalo de tempo entre a irradiação e o sacrifício (1º sacrifício). De acordo com os resultados e a análise estatística, a irradiação por elétrons não ocasionou alteração da densidade óssea nas estruturas ventrais.

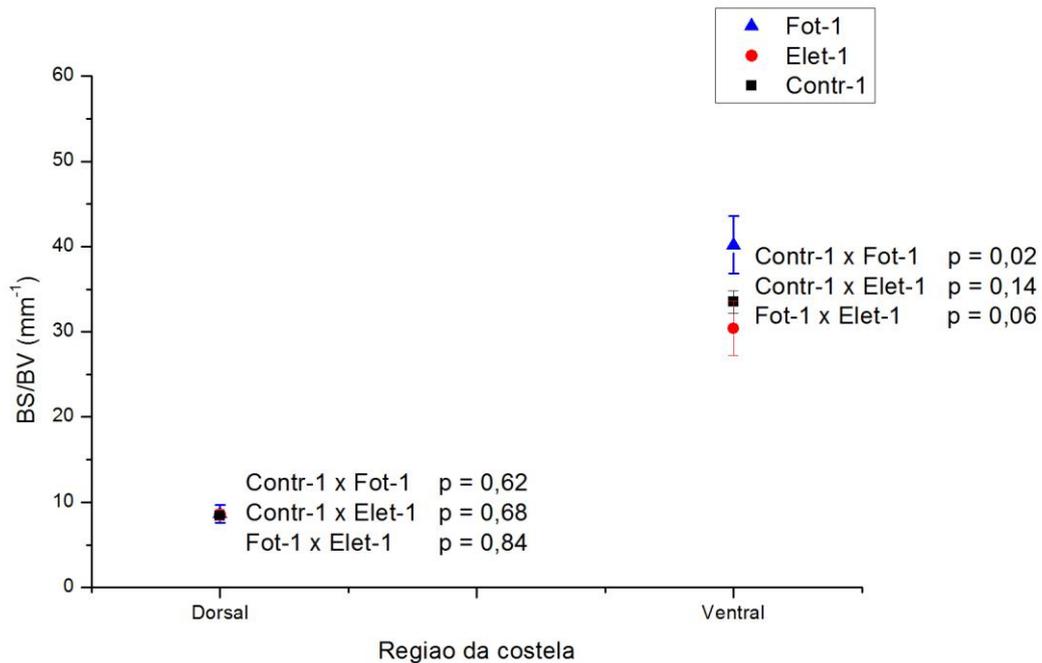


Figura IV.8 – Gráfico de BS/BV referente ao 1º sacrifício

Vejamos agora a análise do índice BS/BV. A relação entre superfície óssea e volume ósseo determina o quão fragmentada é a amostra em questão. Quando esta razão é alta, pode-se afirmar que a amostra é mais fragmentada, quando comparada com outra em que esta razão é menor. O gráfico da Figura IV.8 apresenta a análise de BS/BV. Os resultados da Tabela IV.1 mostram que há pequena diferença entre os grupo irradiados (Elet-1 e Fot-1) e o de controle (Contr-1) na região dorsal, assim como podemos notar na Figura IV.8. Como a região dorsal é composta basicamente de osso cortical, o índice BS/BV apresenta valores baixos (pouco fragmentado) e devido à homogeneidade característica dos ossos corticais, o desvio padrão deste índice é baixo. Nesta região, não houve diferença entre os grupos Contr-1, Elet-1 e Fot-1. Na região ventral, a variação deste índice sempre é maior, já que sua composição é basicamente trabecular, resultando numa maior razão área-superfície (BS/BV). A análise estatística revelou que o grupo Fot-1 apresentou valor de BS/BV significativamente maior ($p = 0,02$) na região ventral, em relação ao grupo de controle (Contr-1).

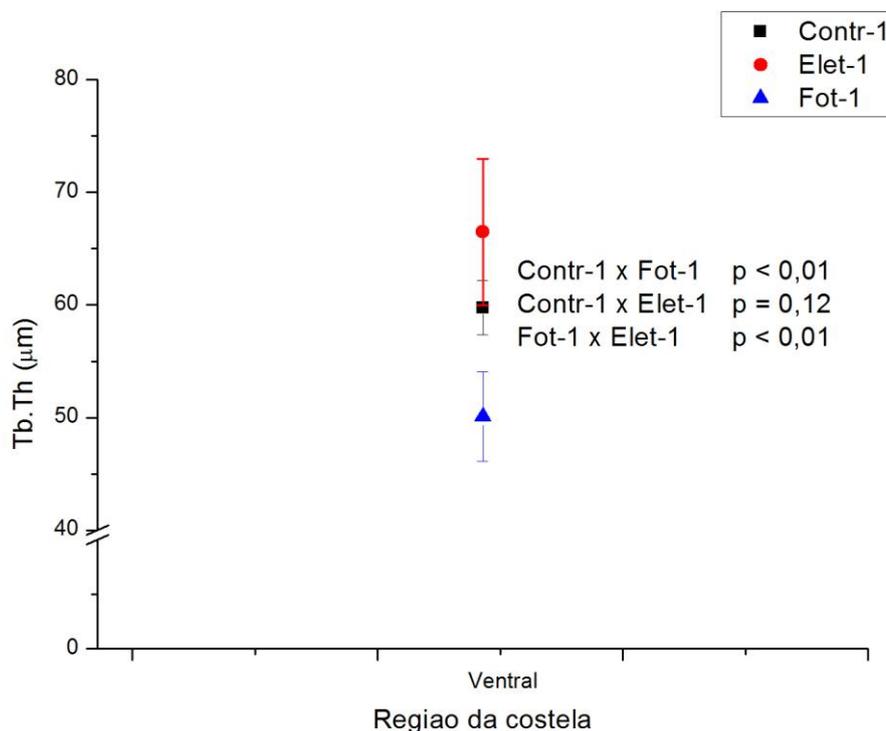


Figura IV.9 – Gráfico de Tb.Th referente ao 1º sacrifício

Os índices secundários foram avaliados somente nas regiões ventrais, tendo em vista a ausência de trabéculas na região dorsal. Com relação à espessura trabecular (Tb.Th) (Figura IV.9), o grupo irradiado com fótons (Fot-1) apresentou valor menor ($p < 0,01$) do que o grupo de controle (Contr-1). Já o grupo irradiado com elétrons (Elet-1) não apresentou diferença significativa na espessura trabecular média.

O gráfico da Figura IV.10 representa o parâmetro Tb.N (densidade trabecular). Nele nota-se que o grupo irradiado com fótons apresenta o índice Tb.N mais elevado ($p < 0,01$) quando comparado com o grupo controle, enquanto que o grupo irradiado com elétrons apresentou valor de Tb.N menor frente ao grupo de controle, porém não sendo tão significativo ($p = 0,06$).

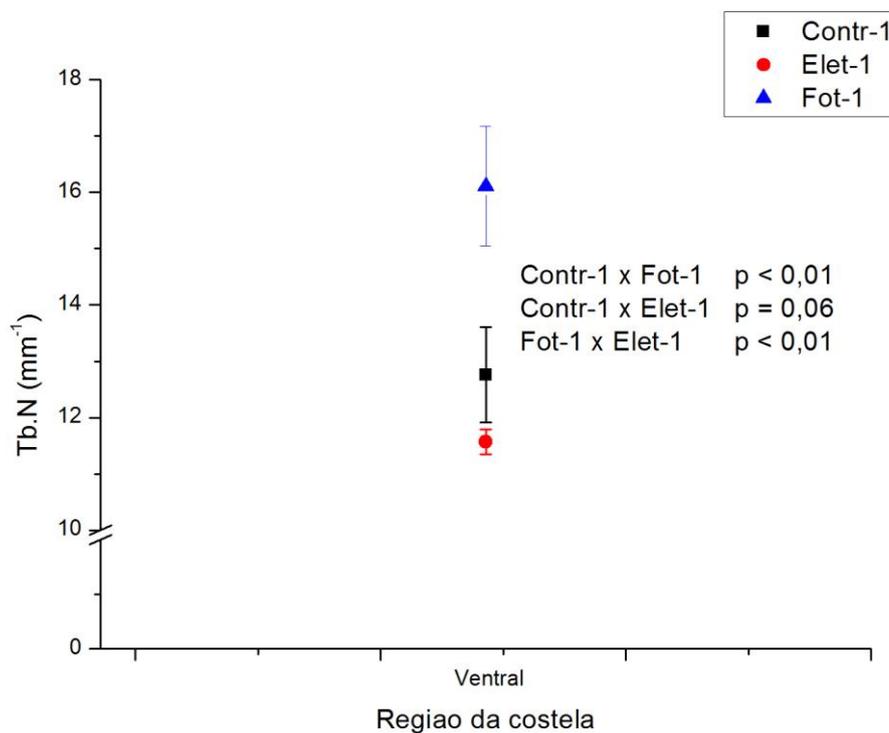


Figura IV.10 – Gráfico de Tb.N referente ao 1º sacrifício

De acordo com a análise dos dados e do gráfico da Figura IV.11, o parâmetro Tb.Sp (separação entre as trabéculas) não apresentou diferença significativa entre os valores obtidos para os grupos irradiados e o grupo de controle.

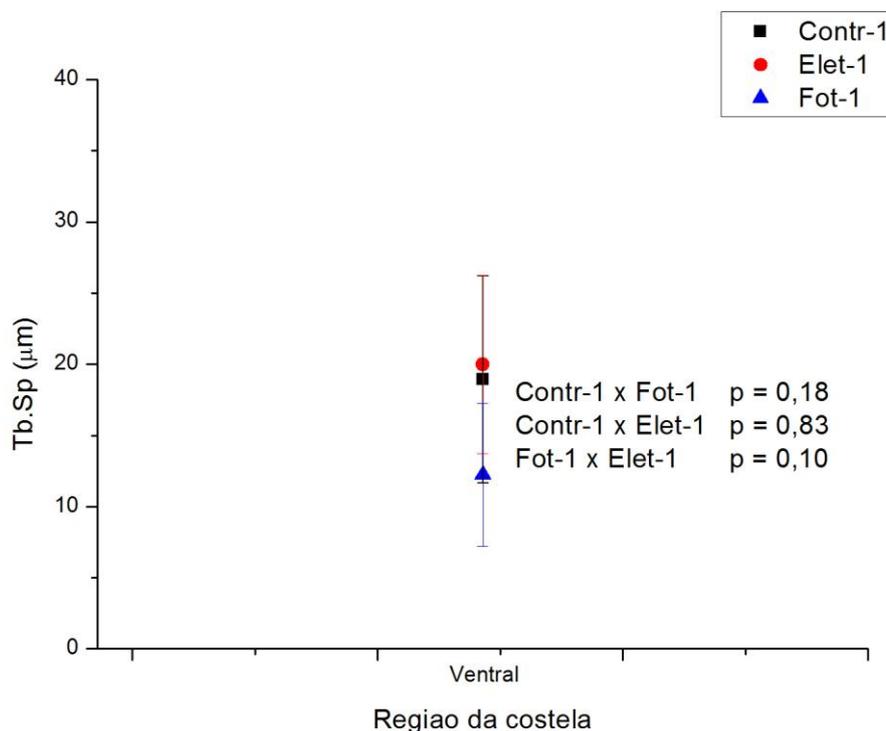


Figura IV.11 – Gráfico de Tb.Sp referente ao 1º sacrifício

Apesar de não ter havido diferença significativa no índice BS/BV para a região dorsal entre os animais irradiados com fótons e os de controle (Figura IV.8), notáveis diferenças nas estruturas podem ser percebidas. A região dorsal, formada por osso denso, apresenta uma maior porosidade em todas as amostras irradiadas com fótons na região próxima à junção da dorsal com a ventral (grupo Fot-1). Esta característica não ocorre nos ossos dos animais de controle ou irradiados com elétrons. As Figura IV.12, Figura IV.13 e Figura IV.14 apresentam as fatias de amostras de controle, irradiadas com elétrons e com fótons respectivamente, da região próxima à junção dorsal-ventral. Todas as seções transversais apresentadas estão há 50 slices da junção.

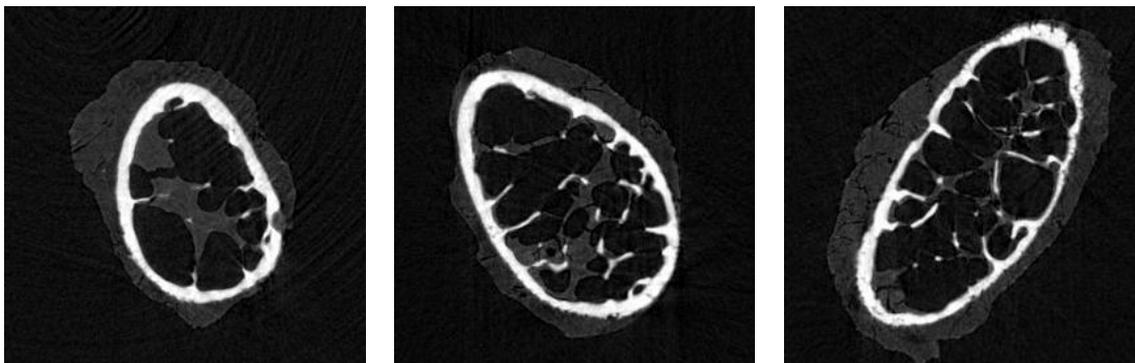


Figura IV.12 – Seção transversal de amostras de controle

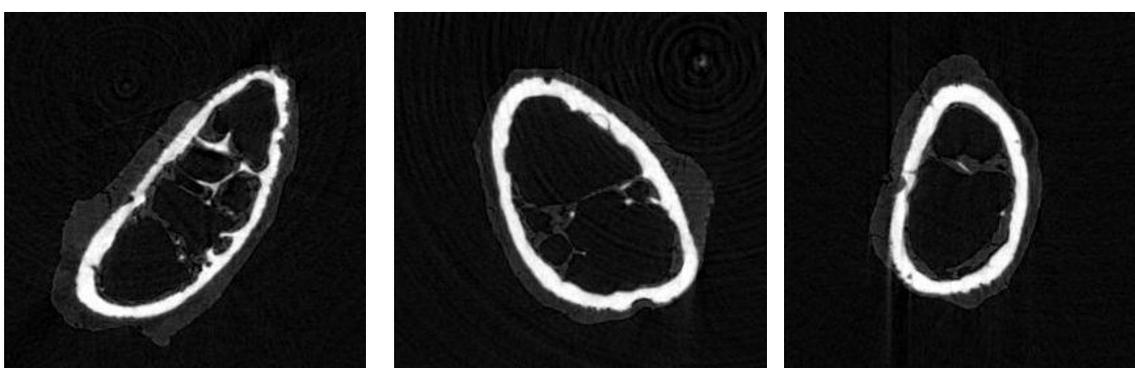


Figura IV.13 – Seção transversal de amostras irradiadas com elétrons

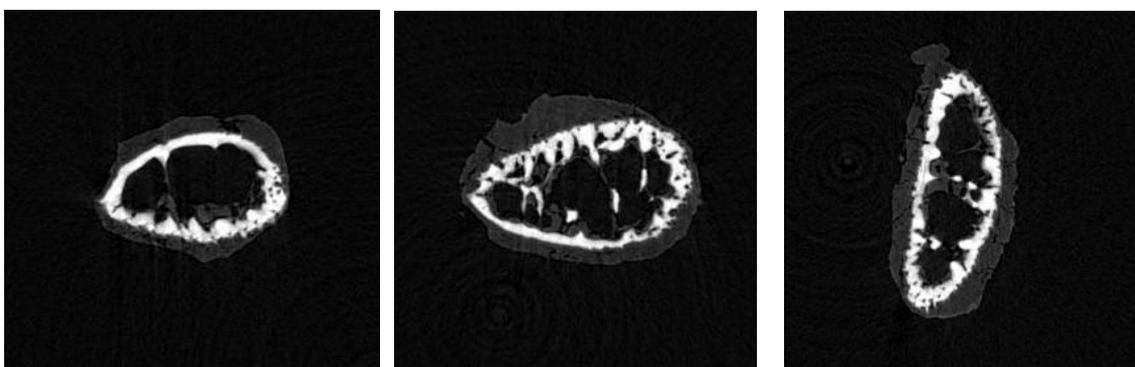


Figura IV.14 – Seção transversal de amostras irradiadas com fótons

Nas imagens 3D é possível notar a presença desta maior porosidade na região cortical das amostras irradiadas com fótons (Figura IV.15, Figura IV.16 e Figura IV.17).

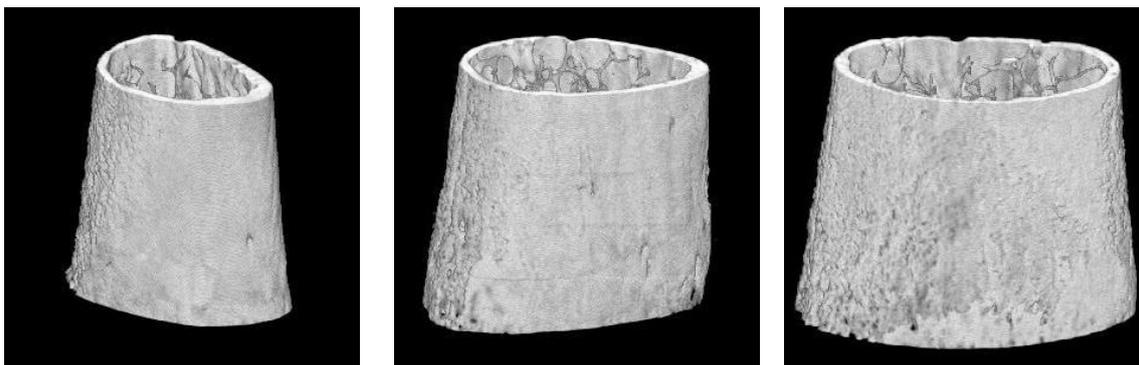


Figura IV.15 – Reconstrução 3D de amostras de controle



Figura IV.16 – Reconstrução 3D de amostras irradiadas com elétrons

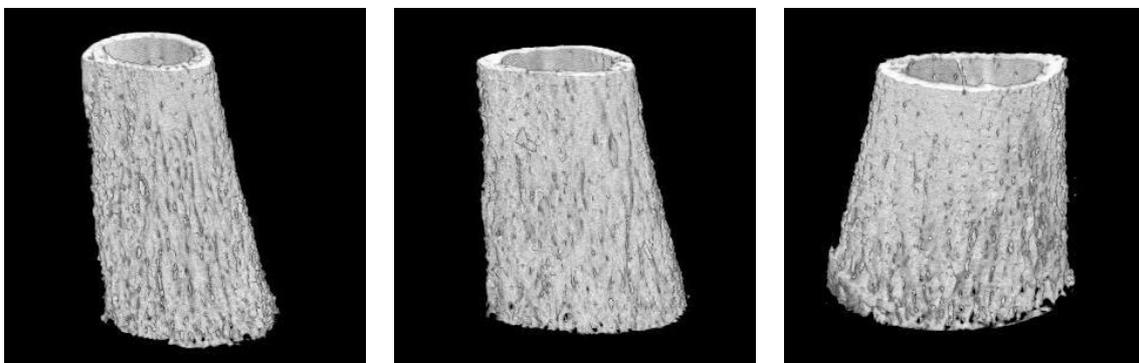


Figura IV.17 – Reconstrução 3D de amostras irradiadas com fótons

Outra peculiaridade destas costelas irradiadas com fótons é a tendência de esta porosidade aparecer preferencialmente de um único lado do osso. Nas imagens 3D e 2D da Figura IV.18 nota-se claramente esta peculiaridade. O lado esquerdo (mais poroso) do *slice* central na Figura IV.18 fica posicionado internamente na anatomia do rato, enquanto o lado direito do *slice* posiciona-se na região mais externa, próximo à pele. Ou seja, o aumento da porosidade cortical é predominante em uma das faces do osso, interna à caixa torácica.

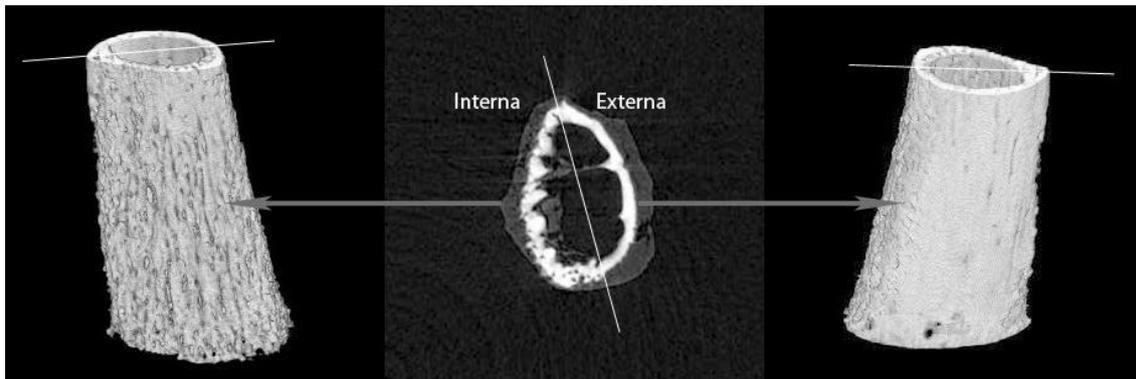


Figura IV.18 – Tendência de aumento da porosidade de um dos lados de uma amostra irradiada com fótons.

IV.2 Fótons x Controle (μ TC) – 2º sacrifício

De forma a avaliar possíveis alterações tardias nas microestruturas ósseas das costelas, foram feitas novas medidas com maior tempo de pós-irradiação (2º sacrifício). Como não houve diferença significativa de nenhum dos parâmetros histomorfométricos entre as amostras dos ratos irradiados com elétrons e aqueles de controle do primeiro sacrifício (Contr-1 x Elet-1), somente ratos irradiados com fótons foram utilizados. Os ratos foram irradiados com mesma idade daqueles do 1º sacrifício (3 meses) e mantidos vivos sob constante observação durante 5 meses após a irradiação. Após este período os grupos, tanto de irradiados (Fot-2) quanto os de controle (Contr-2) foram sacrificados e em seguida dados os prosseguimentos conforme explanado no capítulo 3 desta tese.

IV.2.1 Imagens

Desta forma, a segunda parte destes resultados engloba amostras irradiadas com fótons, com um período de pós-irradiação maior (2º sacrifício). Os ratos de controle foram mantidos sob os mesmos cuidados que aqueles que passaram por procedimento de irradiação, sendo sacrificados no mesmo momento que os irradiados. A Figura IV.19 mostra imagens de reconstruções 3D e 2D das costelas dorsais de ratos submetidos a irradiação com fótons, sendo sacrificados 5 meses após a irradiação (2º sacrifício).

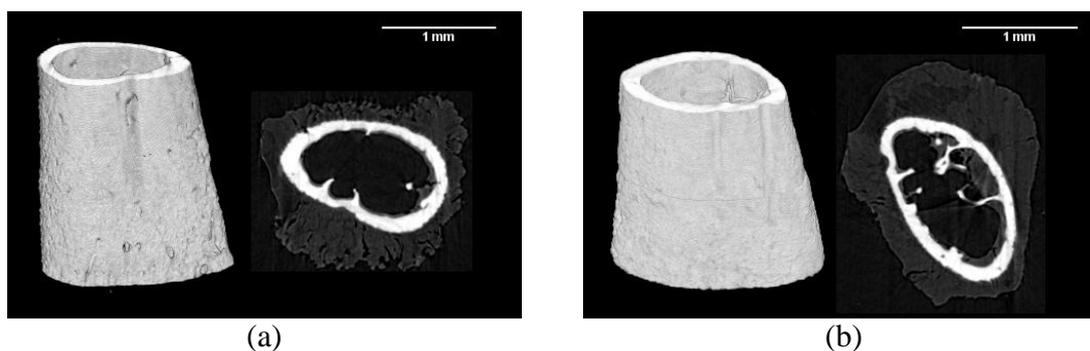


Figura IV.19 – Imagens 3D e 2D de costelas dorsais dos grupos (a) Contr-2 e (b) Fot-2

Na Figura IV.20 são apresentadas imagens 3D e 2D de costelas ventrais de ratos de controle e fótons, com tempo de pós-irradiação de 5 meses. As imagens das demais amostras são apresentadas no anexo A

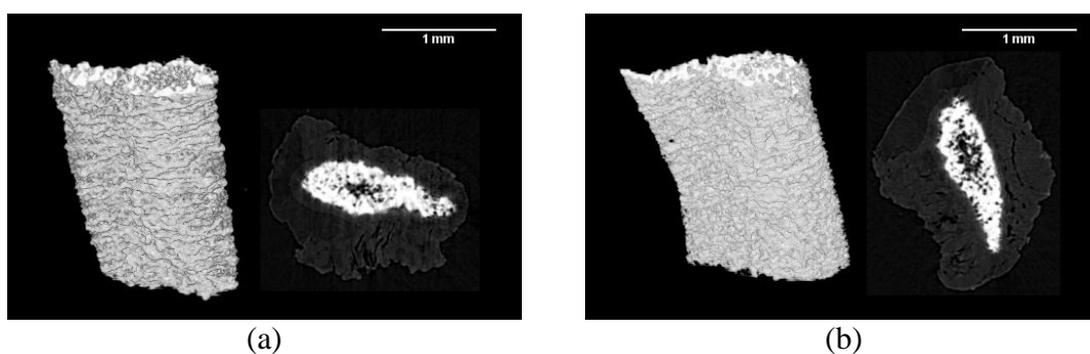


Figura IV.20 – Imagens 3D e 2D de costelas ventrais dos grupos (a) Contr-2 e (b) Fot-2

IV.2.2 Quantificação histomorfométrica

As Tabela IV.3 e Tabela IV.4 apresentam os dados de quantificação histomorfométrica das imagens 3D referentes às amostras do 2º sacrifício, ou seja, aqueles animais que foram sacrificados 5 meses após a irradiação do grupo irradiado. A quantificação do 2º sacrifício foi feita a partir de 250 *slices* para cada amostra.

Tabela IV.3 – Valores histomorfométricos das costelas dorsais referentes ao 2º sacrifício

COSTELAS DORSAIS		
Grupo	BV/TV (%)	BS/BV (mm ⁻¹)
Contr-2 (N = 5)	75,25 ± 4,58	8,52 ± 0,67
Fot-2 (N = 5)	43,39 ± 6,86	17,77 ± 4,72

Tabela IV.4 – Valores histomorfométricos das costelas ventrais referentes ao 2º sacrifício.

COSTELAS VENTRAIS					
Grupo	BV/TV (%)	BS/BV (mm ⁻¹)	Tb.Th (μm)	Tb.N (mm ⁻¹)	Tb.Sp (μm)
Contr-2 (N = 5)	77,00 ± 6,16	30,90 ± 2,10	67,48 ± 5,60	11,54 ± 0,26	22,29 ± 8,77
Fot-2 (N = 5)	81,15 ± 4,88	36,11 ± 2,59	55,60 ± 3,98	14,61 ± 0,41	12,89 ± 3,26

A seguir são apresentadas as análises dos gráficos referentes aos grupos do 2º sacrifício.

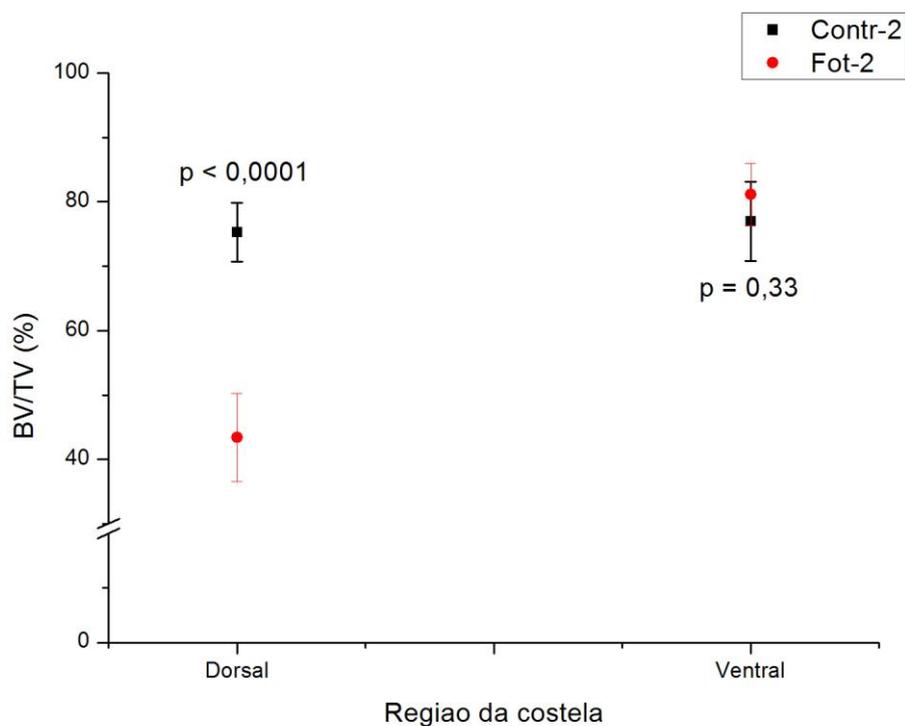


Figura IV.21 – Gráfico de BV/TV referente ao 2º sacrifício

Na Figura IV.21 podemos notar que o grupo irradiado apresentou uma diminuição índice BV/TV da região dorsal ($p < 0,0001$) consideravelmente grande (-42,3%) em comparação com o grupo de controle. Já na região ventral, não houve variação significativa entre o grupo de controle e o irradiado.

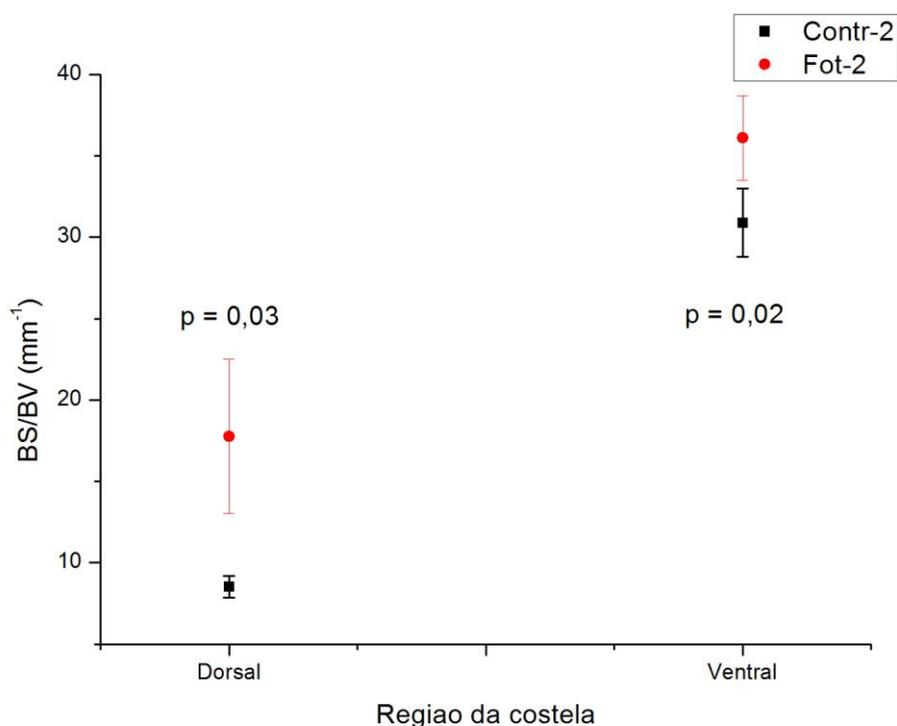


Figura IV.22 – Gráfico de BS/BV referente ao 2º sacrifício

Os resultados de BS/BV são apresentados no gráfico da Figura IV.22. Diferentemente do grupo irradiado com fótons do primeiro sacrifício (Fot-1), o grupo do segundo sacrifício apresentou um aumento significativo ($p = 0,03$) na razão superfície-volume ósseo, referente à região dorsal, apesar do grande desvio padrão. Esta diferença deu-se principalmente devido à diminuição de BV, como visto na análise do índice BV/TV (Figura IV.21). O aumento do desvio padrão da amostra irradiada indica variações mais acentuadas deste índice, o que sugere possíveis efeitos aleatórios e não-controláveis devido à irradiação. Na região ventral também houve aumento no índice BS/BV do grupo irradiado ($p = 0,02$)

O índice Tb.Th (Figura IV.23), assim como nos animais do primeiro sacrifício, também apresentou diminuição no grupo irradiado em comparação ao de controle ($p = 0,01$), na região ventral.

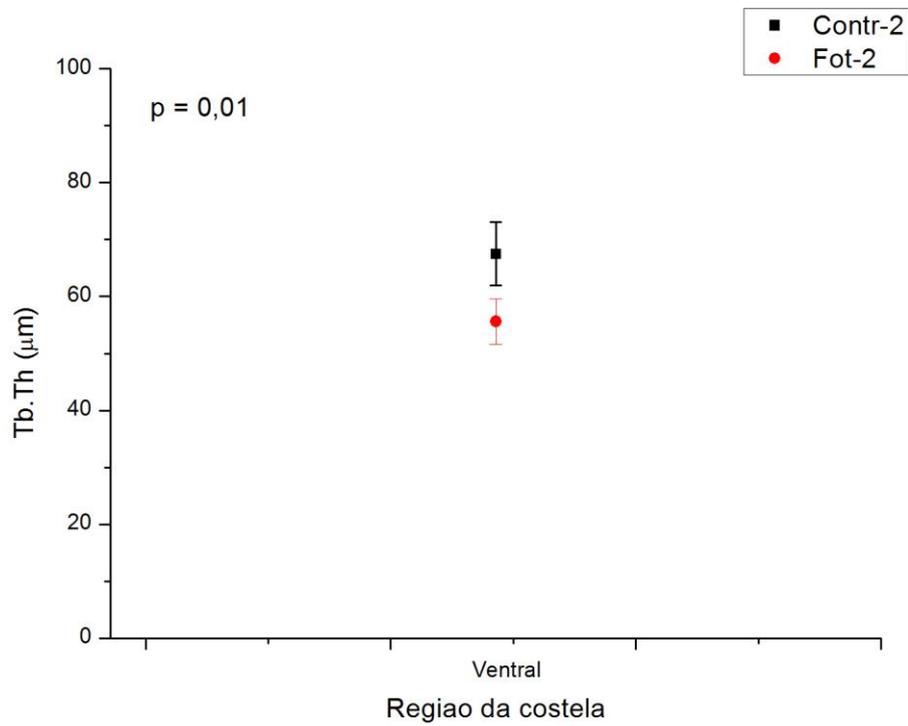


Figura IV.23 – Gráfico de Tb.Th referente ao 2º sacrifício

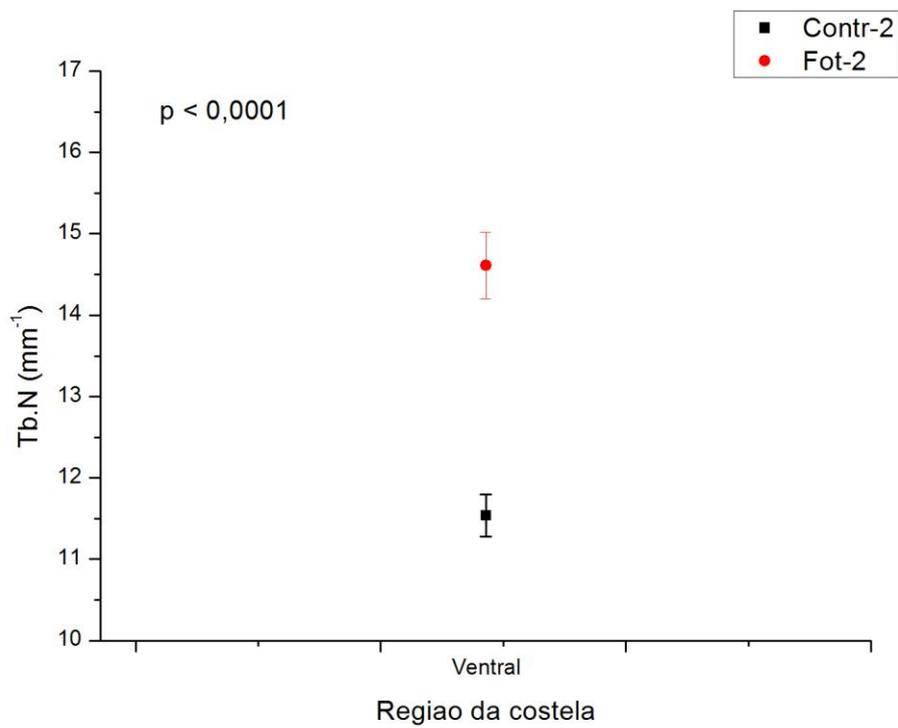


Figura IV.24 – Gráfico de Tb.N referente ao 2º sacrifício

O índice Tb.N (Figura IV.24) foi o que apresentou diferença mais significativa ($p < 0,0001$) dentre os grupos analisados do segundo sacrifício. O número médio de trabéculas do grupo irradiado aumentou 26,6% em comparação com o grupo de controle.

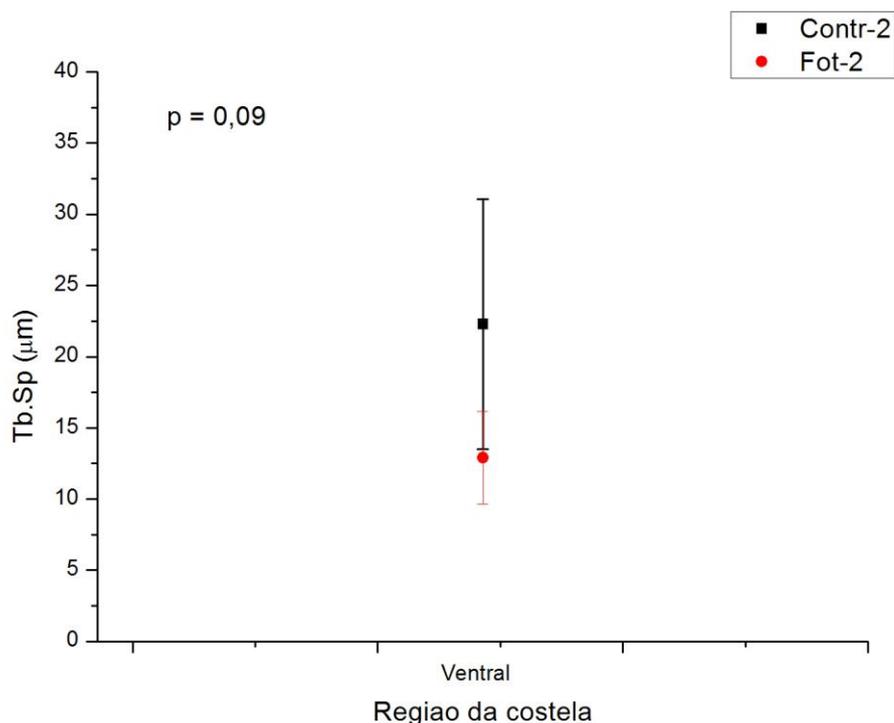


Figura IV.25 – Gráfico de Tb.Sp referente ao 2º sacrifício

Assim como nos grupos do primeiro sacrifício, não houve diferença significativa no índice Tb.Sp do segundo sacrifício, como podemos notar na Figura IV.25.

Ao se comparar os resultados de histomorfometria do grupo Fot-2 com aqueles do grupo Fot-1 (Tabela IV.5 Tabela IV.6), percebe-se grande variação de alguns parâmetros, principalmente no BV/TV da região dorsal, com uma diminuição de 45% ($p < 0,001$). Outro índice que se destaca é o BS/BV desta mesma região, com aumento de 106% ($p = 0,03$). Na região ventral, os índices não se diferem tanto, tendo destaque somente o índice Tb.N que reduziu 9%, porém significativamente ($p = 0,04$).

Tabela IV.5 – Valores histomorfométricos das costelas dorsais comparando o 1º sacrifício com o 2º sacrifício

COSTELAS DORSAIS		
Grupo	BV/TV (%)	BS/BV (mm ⁻¹)
Fot-1 (N = 6)	78,58 ± 3,27	8,62 ± 1,037
Fot-2 (N = 5)	43,39 ± 6,86	17,77 ± 4,72

Tabela IV.6 – Valores histomorfométricos das costelas ventrais comparando o 1º sacrifício com o 2º sacrifício.

COSTELAS VENTRAIS					
Grupo	BV/TV (%)	BS/BV (mm ⁻¹)	Tb.Th (µm)	Tb.N (mm ⁻¹)	Tb.Sp (µm)
Fot-1 (N = 6)	80,62 ± 7,65	40,19 ± 3,37	50,09 ± 3,97	16,11 ± 1,06	12,25 ± 5,02
Fot-2 (N = 5)	81,15 ± 4,88	36,11 ± 2,59	55,60 ± 3,98	14,61 ± 0,41	12,89 ± 3,26

Porém não se pode afirmar nada sobre esta diferença, tendo em vista que os animais do grupo Fot-1 foram sacrificados com três meses de idade, enquanto os animais do grupo Fot-2, com oito meses de idade. A diferença de idades pode ser responsável por diversas alterações ósseas, principalmente a osteoporose (THURNER *et al.*, 2006), tornando impossível o controle de tais alterações.

IV.3 Fótons x Controle (µXRF) – 2º sacrifício

Na terceira parte deste capítulo, são apresentados os resultados de microfluorescência de raios X, referentes às amostras do segundo sacrifício. A análise por µXRF não foi aplicada aos animais do primeiro sacrifício.

As imagens são formadas por um mapeamento ponto a ponto da região selecionada da amostra, de maneira que cada ponto representa a intensidade do elemento em questão. As intensidades foram normalizadas para serem apresentadas em 256 diferentes tonalidades de cores (0-255), conforme escala presente em cada imagem. As imagens foram normalizadas **dentro de cada elemento**, tomando como valor 0 (zero) a menor intensidade do elemento em questão, detectável pelo sistema e tomando como valor 255 o maior valor de intensidade apresentado dentro do mesmo elemento

em questão. Ou seja, desta maneira é possível compararmos a distribuição de intensidades nas amostras entre os grupos de controle e irradiados dentro de cada elemento. Os elementos analisados foram: K, Ca, Fe, Zn e Sr.

A partir dos mapas dos diferentes elementos, podem-se destacar algumas peculiaridades referentes a alguns elementos. O cálcio, por exemplo, parece apresentar uma competição com o ferro, quanto a sua localização. Através do mapeamento, nota-se que a distribuição do cálcio ocorre inteiramente na região do osso, enquanto a do ferro somente ocorre no tecido adjacente remanescente após a limpeza do osso – este tecido é praticamente invisível a olho nu, e sua remoção poderia danificar a estrutura da costela, tendo em vista o reduzido tamanho. (Figura IV.26)

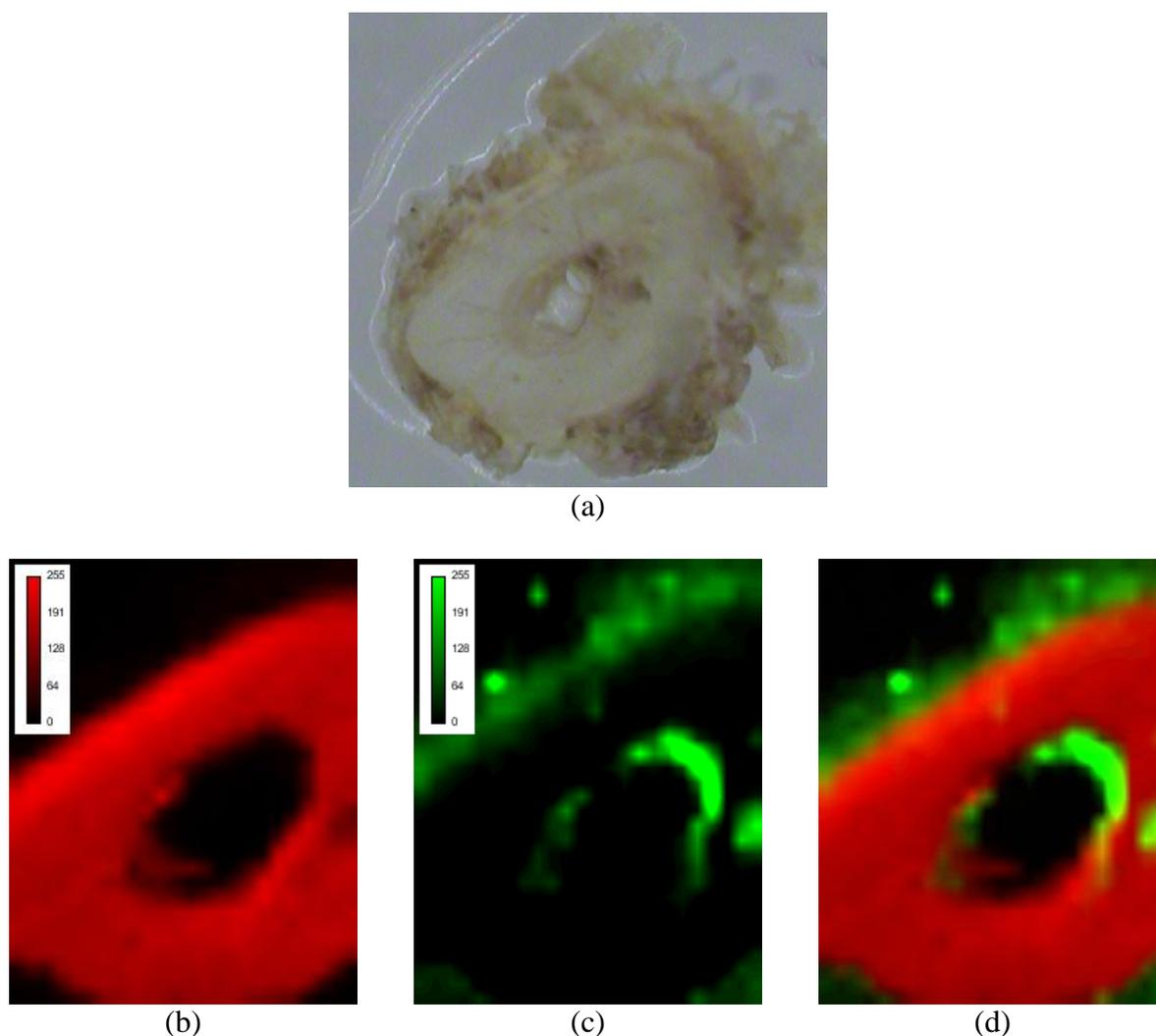


Figura IV.26 – (a) fatia de uma amostra de controle usada na μ XRF; (b) distribuição do Ca na amostra; (c) distribuição do ferro na amostra e; (d) mesclagem das distribuições de cálcio e ferro.

O estrôncio e o potássio apresentam uma distribuição heterogênea no interior do osso. Já os demais elementos analisados apresentaram uma distribuição mais homogênea (Figura IV.27).

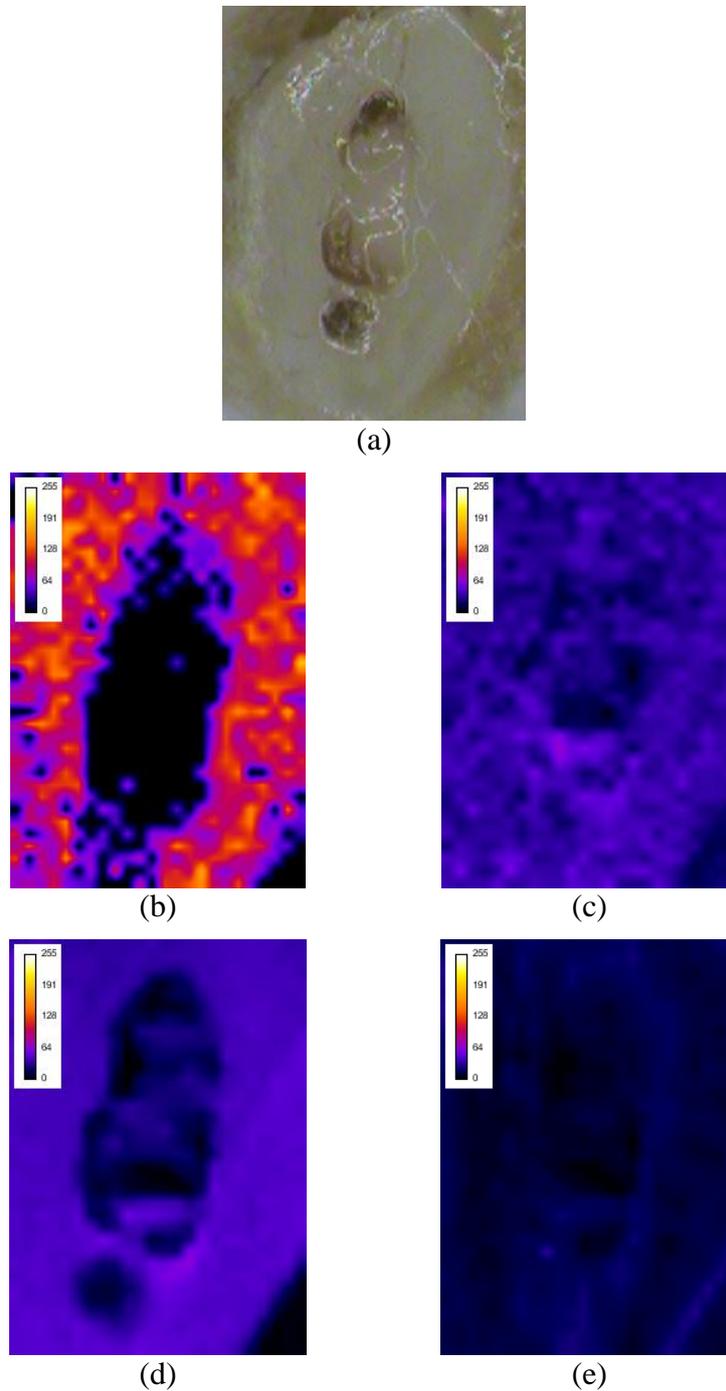


Figura IV.27 – (a) fatia de uma amostra da região cortical usada na μ XRF; (b) distribuição do Sr; (c) distribuição do K; (d) distribuição do Ca; e (e) distribuição do Zn.

O zinco se distribui em toda a amostra, com concentração maior na região cortical, porém com concentração predominante nas periferias, conforme indicado por setas na Figura IV.28. Isto ocorre porque o zinco é um dos principais responsáveis no processo de formação óssea (GOMEZ *et al.*, 1999)

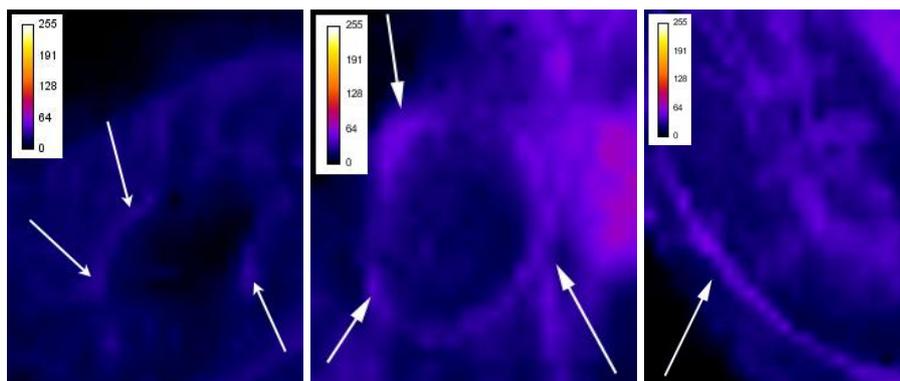


Figura IV.28 – Distribuição de Zinco para uma amostra cortical de controle

Alguns elementos estão presentes basicamente no interior dos ossos, como o cálcio e o estrôncio. Outros, como é o caso do zinco e do potássio, encontram-se nas bordas do osso, ainda que em concentração bem menor.

No que diz respeito à distribuição elementar em consequência da irradiação, pôde-se perceber que, em geral, não há tendência de alteração na distribuição elementar, e nada se pode afirmar quanto à intensidade relativa elementar, exigindo uma análise semi-quantitativa ou mesmo quantitativa para maiores conclusões (Anexo A).

CAPÍTULO V

V CONCLUSÕES

A tomografia computadorizada é uma técnica capaz de permitir investigações não destrutivas e se mostrou a mais versátil quando se trata da área médica. Quando realizada através da utilização da luz síncrotron, permite obtenção de imagens 3D de estruturas muito pequenas, da ordem de dezenas de micrômetros, além fornecer uma distribuição 3D dos coeficientes de atenuação linear da amostra.

Neste trabalho, a microtomografia computadorizada por luz síncrotron se mostrou bastante eficiente na avaliação de pequenas estruturas, principalmente na quantificação trabecular de costelas de ratos.

Os resultados mostraram a capacidade da técnica de quantificação através da histomorfometria por μ TC de revelar alterações nas microestruturas ósseas da ordem de poucos micrômetros com bastante exatidão, permitindo com poucas amostras um desvio padrão aceitável.

A técnica de microfluorescência de raios X foi introduzida nesta tese como um complemento à análise quantitativa da microtomografia, e mostrou-se eficaz na determinação da distribuição dos elementos químicos presentes nas costelas dos ratos, permitindo avaliar qualitativamente a distribuição da concentração dos principais elementos, diante de amostras de controle e amostras irradiadas.

A análise dos resultados obtidos por microtomografia computadorizada revela possíveis alterações estruturais de algumas amostras de costelas que foram irradiadas. As diferenças mais relevantes aparecem nas costelas que foram irradiadas com fótons.

Os resultados dos animais irradiados do grupo Fot-2 apresentou grande diferença em comparação com o grupo Fot-1. Porém a diferença de idades dos animais, torna impossível de se determinar se a causa seria devido à irradiação.

Não foram encontradas alterações significativas nas estruturas das costelas tratadas com feixes de elétrons. Já os resultados para os animais irradiados com fótons, apresentaram alterações nas estruturas em alguns parâmetros histomorfométricos.

A análise dos parâmetros histomorfométricos dos animais com maior tempo de pós-irradiação (grupos do 2º sacrifício) mostrou diferenças significativas tanto nas regiões dorsais, quanto nas ventrais da maioria dos parâmetros (BV/TV, BS/BV, Tb.Th, Tb.N), quando comparados com seus controles. Ao compararmos o grupo do 2º sacrifício com seu controle, acredita-se que a diferença pode ser creditada aos efeitos da irradiação, tendo em vista que os animais de controle e irradiados foram sacrificados com a mesma idade. A mudança mais notável foi para o índice BV/TV na região dorsal. A perda óssea relativa entre os animais irradiados e de controle na região dorsal da costela, acompanhada por um aumento de BS/BV parecem indicar que a perda óssea induzida pela radiação aparecem também através do aumento da porosidade cortical. Já foi reportado que a radioterapia produz um ambiente de hipóxia e hipovascularidade em tecidos, e como consequência da redução na vascularização óssea, alterações no balanço de osteoclastos e osteoblastos vão levar a mudanças na formação óssea, o que pode explicar os resultados encontrados nesta tese.

Por fim, a análise histomorfométrica 3D através da microtomografia computadorizada por luz síncrotron mostrou-se excelente na determinação de alterações nas microestruturas de costelas de ratos, com resolução na ordem de micrometros.

Na análise qualitativa por μ XRF das costelas, pôde-se notar algumas peculiaridades das distribuições de alguns elementos. Os resultados sugerem possíveis alterações nas intensidades relativas dos elementos Ca e P. Porém há necessidade de exploração mais detalhada da técnica para este tipo de análise, incluindo análises quantitativas, tendo em vista que até o momento não há nas bibliografias análises específicas sobre o tema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMI, A., ARFELLI, F., BARROSO, R. C., BERGAMASCHI, A., BILLÈ, F., BREGANT, P., BRIZZI, F., CASARIN, K., CASTELLI, E., CHENDA, V., DALLA PALMA, L., DREOSSI, D., FAVA, C., LONGO, R., MANCINI, L., MENK, R.-H., MONTANARI, F., OLIVO, A., PANI, S., PILLON, A., QUAI, E., REN KAISER, S., RIGON, L., ROKVIC, T., ZANETTI, A., ZANINI, F., 2005, “Medical Applications of Synchrotron Radiation at the SYRMEP beamline of ELETTRA”, *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research A*, v. 548, pp. 221-227.
- ARFELLI, F., 2000, “Synchrotron Light and Imaging Systems for Medical Radiology”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 454, pp. 11-25.
- ARNOLD, M., STAS P., KUMMERMEHR, J., SCHULTZ-HECTOR, J., TROTT, K., 1998, “Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation”, *Radiotherapy & Oncology*, v. 48, pp. 259-265.
- BARON R.E., 1996, *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 3^a ed. New York, Lippincott-Ravin Publishers.
- BARROSO, R.C., 1997, *Tomografia Computadorizada Seletiva Usando Efeitos de Interferência em Difração de Raios X*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BAXTER, N.N., HABERMANN, E.B., TEPPER, J.E., DURHAM, S.B., VIRNIG, B.A., 2005, “Risk of Pelvic Fracture in Older Women Following Pelvic Irradiation”, *JAMA*, v. 294, n. 20, pp. 2587-2593.
- BERNASCONI, G., HASELBERGER, N., MARKOWICZ, A., 1994. “Applications of a capillary based X-ray microfluorescence system”. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 86, pp: 333-338.

- BERNASCONI, G.A. “Axil: Analysis of x-ray spectra by iterative least squares fitting”. IAEA Laboratories Seibesdof, Austin, 1995.
- BERTOLINI, G., CAPPELANI, F., RESTELLI, G., 1965, Construction and performances of silicon lithium drifted detectors, *Nucl Instrum Methods*, v. 32, pp. 86-92.
- BONTRAGER, K.L., LAMPIGNANO, J.P., 2003, *Tratado de Posicionamento Radiográfico e Anatomia Associada*. 6ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier.
- BRAZ, D., 1997, *Tomografia Computadorizada no Estudo da Mecânica da Fratura em Misturas Asfálticas*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BROOKS, R.A., DI CHIRO, G., 1976, “Principles of Computer Assisted Tomography (CAT) in Radiographic and Radio Isotopic Imaging”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 21, pp. 689-732.
- CASTILHO, R.B., 2006, *Fotoioniozação de Produtos Naturais Voláteis Utilizando Luz Síncrotron e Técnicas de Tempo de Voo*. Tese de D.Sc., COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- CEDERMARK, B., JOHANSSON, H., RUTQVIST, L.E., WILKING, N., 1995, “Stockholm Colorectal Cancer Study Group. The Stockholm I Trial of Preoperative Short Term Radiotherapy in Operable Rectal Carcinoma: a Prospective Randomized Trial”. *Cancer*, v. 75, pp. 2269-2275.
- CEDERMARK, B., JOHANSSON, H., RUTQVIST, L.E., WILKING, N., 1996, “Stockholm Colorectal Cancer Study Group. Randomized Study on Preoperative Radiotherapy in Rectal Carcinoma”, *Ann Surg Oncol*, v. 3, pp. 423-430.
- CHAPPARD, C., BASILLAIS, A., BENHAMOU, L., BONASSIE, A., BRUNET-IMBAULT, B., BONNET, N., PEYRIN, F., 2006, “Comparison of Synchrotron Radiation and Conventional X-Ray Microcomputed Tomography for Assessing

Trabecular Bone Microarchitecture of Human Femoral Heads”, *Medical Physics*, v. 33, n. 9, pp. 3568-3577.

CHEN, H.H.W, LEE, B-F., GUO, H-R., SU, W-R., CHIU, N-T., 2002, “Changes in Bone Mineral Density of Lumbar Spine after Pelvic Radiotherapy”, *Radiotherapy and Oncology*, v. 62, pp. 239-242.

DÂNGELO, J.G., FATTINI, C.A., 2000 *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar*. 2ª ed. São Paulo, Atheneu.

DIEDERICHS, G., LINK, T.M., KENTENICH, M., SCHWIEGER, K., HUBER, M.B., BURGHARDT, A.J., MAJUMDAR, S., ROGALLA, P., ISSEVER, A.S., 2009, “Assessment of trabecular bone structure of the calcaneus using multi-detector CT: Correlation with microCT and biomechanical testing”, *Bone*, v. 44, pp. 976-983.

DING, M., ODGAARD, A., HVID, I., 1999, “Accuracy of Cancellous Bone Volume Fraction Measured by Micro-CT Scanning”, *Journal of Biomechanics*, v. 32, pp. 323-326.

DONOVAN, D.J., HUYNH, T.V., PURDOM, E.B., JOHNSON, R.E., SNIEZEK, J.C., 2005, “Osteoradionecrosis of the cervical spine resulting from radiotherapy for primary head and neck malignancies: operative and nonoperative management”, *J. Neurosurg: Spine*, v. 3, pp. 159-164.

DUDZIAK, M.E., SAADEH, P.B., MEHRARA, B.J., STEINBRECH, D.S., GREENWALD, J.A., GITTES, G.K., LONGAKER, M.T., 2000, “The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro”, *Plast. Reconstr. Surg.*, v.106, pp. 1049-1061.

EIFEL, P.J., DONALDSON, S.S., THOMAS, P.R.M., 1995, “Response of Growing Bone to Irradiation: a Proposed Late Effects Scoring System”, *Int. J Radiation Oncology Biol. Phys.*, v. 31, n. 5, pp. 1301-1307.

- ERIKSEN, E.F, AXELROD, D.W., MEILSEN, F., 1994, *Bone histomorphometry*. New York, Raven Press.
- FELDKAMP, L.A., GOLDSTEIN, S.A., PARFITT, A.M., JESION, G., KLEEREKOPER, M., 1989, “The Direct Examination of Three-dimensional Bone Architecture in Vitro by Computed Tomography”, *J. Bone Miner. Res.*, v. 4, n. 1, pp. 3-11.
- GILSANZ, V., CARLSON, M.E., ROE, T.F., ORTEGA, J.A., 1990, “Osteoporosis after Cranial Irradiation for Acute Lymphoblastic Leukemia”, *J. Pediatr.*, v. 117, pp. 238-244.
- GOMEZ, S. RIZZO, R., POZZI-MUCELLI M., BONUCCI E., VITTUR F., 1999, “Zinc mapping in bone tissues by histochemistry and synchrotron radiation-induced X-ray emission: correlation with the distribution of alkaline phosphatase”, *Bone*, v. 25, pp. 33-38.
- GREEN, J.A., KIRWAN, J.M., TIERNEY, J.F., SYMONDS, P., FRESCO, L., COLLINGWOOD, M., WILLIAMS C.J., 2001, “Survival and recurrence after concomitant chemotherapy and radiotherapy for cancer of the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis” *The Lancet*, v. 358, pp. 781-786.
- GUO, X.E., KIM, C.H., 2002, “Mechanical Consequence of Trabecular Bone Loss and its Treatment: a Three-dimensional Model Simulation”, *Bone*, v. 30, n. 2, pp. 404-411.
- HAMILTON, S.A., PECAUT, M.J., GRIDLEY, D.S., TRAVIS, N.D., BANDSTRA, E.R., WILLEY J.S., NELSON, G.A., BATEMAN, T.A., 2006, “A murine model for bone loss from therapeutic and space-relevant sources of radiation”, *J Appl Physiol*, v, 101, pp. 789-793.

- HARA, T., TANCK, E., HOMMINGA, J., HUISKES, R., 2002. “The influence of microcomputed tomography threshold variations on the assessment of structural and mechanical trabecular bone properties. *Bone*, v. 31, pp. 107-109.
- HERSHMAN, D.L., MCMAHON, D.J., CREW, K.D., SHAO, T., CREMERS, S., BRAFMAN, L., AWAD, D., SHANE, E., 2010 “Prevention of Bone Loss by Zoledronic Acid in Premenopausal Women Undergoing Adjuvant Chemotherapy Persist up to One Year following Discontinuing Treatment”. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 95, pp. 559-566.
- HOLM, T., SINGNOMKLAO, T., RUTQVIST, L.E., CEDERMARK, B., 1996, “Adjuvant preoperative radiotherapy in patients with rectal carcinoma. Adverse effects during long term follow-up of two randomized trials”, *Cancer*, v.78, n.5, pp. 968-976.
- HOPEWELL, J.W., 2003, “Radiation-Therapy Effects on Bone Density”, *Med. Pediatr Oncol.*, v. 41, pp. 208-211.
- HOUNSFIELD, G.N., 1973, “Computerized Transverse Axial Scanning (Tomography). Description of System”, *British Journal of Radiology*, v. 46, pp. 1016-1022.
- ITO, M., NAKAMURA, T., MATSUMOTO, T., TSURUSAKI, K., HAYASHI, K., 1998, “Analysis of Trabecular Microarchitecture of Human Iliac Bone Using Microcomputed Tomography in Patients with Hip Arthrosis with or without Vertebral Fracture”, *Bone*, v. 23, n. 2, pp. 163-169.
- JACKSON, J.D., 1999, *Classical Electrodynamics*. 3^a ed. New York, John Wiley & Sons Inc.
- KALENDER, W.A., 2006, “X-Ray Computed Tomography”, *Physics in Medicine and Biology*, v. 51, pp. R29-R43.

- KRÜSE, J.J., ZURCHER, C., STROOTMAN, E.G., BART, C.I., SCHLAGWEIN, N., LEER, J.W., WONDERGEM, J., 2001, “Structural changes in the auricles of the rat heart after local ionizing irradiation”. *Radiother Oncol.* v. 58, pp. 303-311.
- MANDARIM-DE-LACERDA, C.A., 2003, “Stereological Tools in Biomedical Research”, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.75, pp. 469-486.
- MARGARITONDO, G., 1995, “A Primer in Synchrotron Radiation: Everything You Wanted to Know About SEX (Synchrotron Emission of X-Rays) But Were Afraid to Ask”, *Journal of Synchrotron Radiation*, v. 2, pp. 148-154.
- MARTÌN-BADOSA, E., ELMOUTAOUAKKIL, A., NUZZO, S., AMBLARD, D., VICO, L., PEYRIN, F., 2003, “A Method for the Automatic Characterization of Bone Architecture in 3D Mice Microtomographic Images”, *Computerized Medical Imaging and Graphics*, v. 27, pp. 447-458.
- MASSIN, P., DUPARC, J., 1995, “Total Hip Replacement in Irradiated Hips”, *J Bone Joint Surg.*, v. 77, n. 6, pp. 847-852.
- MCARDLE, C.S., MCMILLAN, D.C., GREENLAW, N. MORRISON, D.S., 2010, “Adjuvant radiotherapy and chemotherapy in breast cancer: 30 year follow-up of survival” *BMCCancer*, v. 10, pp. 398-402.
- MELO JÚNIOR, A.S., 2007, *Análise quantitativa do material particulado na região de Campinas através das técnicas de microfluorescência de raios X e reflexão total usando radiação síncrotron*. Tese de D.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- MÜLLER, R., VAN CAMPENHOUT, H., VAN DAMME, B., VAN DER PERRE, G., DEQUEKER, J., HILDEBRAND, T., RÜEGSEGG, P., 1998, “Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: a Quantitative Structural Comparison of Histological Section and Micro-computed Tomography”, *Bone*, v. 23, n. 1, pp. 59-66.

- NEGLIA, J.P., NESBIT, M.E.J., 1993, “Care and Treatment of Long-term Survivors of Childhood Cancer”, *Cancer*, v. 71, pp. 3386-3391.
- NETTER, F.H., 2004, *Atlas de Anatomia Humana*. 3ª ed. Porto Alegre, Artmed.
- NOGUEIRA, L.P., 2008, *Quantificação histomorfométrica óssea a partir de microtomografia 3D por contraste de fase e transmissão de raios X utilizando luz síncrotron*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- NOGUEIRA, L.P., BRAZ, D., BARROSO, R.C., OLIVEIRA, L.F., PINHEIRO, C.J.G., DROSSI, D., TROMBA, G., 2010, “3D Histomorphometric Quantification of Trabecular Bones by Computed Microtomography using Synchrotron Radiation”, *Micron*, v.41, pp. 990-996.
- NOGUEIRA, L.P., PINHEIRO, C.J.G., BARROSO, R.C., BRAZ, D., de ALMEIDA, C.E., ANDRADE, C.B., TROMBA, G., 2011a, “Preliminary analysis of radiation dose effects to rat femora microstructure using synchrotron radiation computed microtomography” *J. Canc. Res. Exper Oncol*, v. 3(7), PP 76-83.
- NOGUEIRA, L.P., BARROSO, R.C., BRAZ, D., de ALMEIDA, C.E., ANDRADE, C.B., TROMBA, G., 2011b, “Evaluation of Radiation dose effects on rat bones using synchrotron radiation computed microtomography” *AIP Conference Records*, v. 1412 (aceito para publicação).
- NYARUBA, M.M., YAMAMOTO, I., KIMURA, H., MORITA, R., 1998, “Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content”, *Acta Radiol*, v. 39, pp. 43-46.
- OLIVEIRA, L.F., 2002, *Tomografia Computadorizada Tridimensional por Transmissão de Raios X na Análise e Caracterização de Objetos Volumétricos*. Tese de D.Sc., COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

- OLIVEIRA, L.F., LOPES, R.T., 2004, “3D Hismorphometric Quantification From 3D Computed Tomography”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 525. pp. 406-411.
- OVERGAARD, M., 1988, “Spontaneous radiation-induced rib fractures in breast cancer patients treated with postmastectomy irradiation. A clinical radiobiological analysis of the influence of fraction size and dose-response relationships on late bone damage”, *Acta Oncol*, v. 27, pp. 117-122.
- PETTERSSON, N., NYMAN, J., JOHANSSON, K.A., 2009, “Radiation-Induced rib fractures after hypofractionated stereotatic body radiation therapy of non-small cell lung cancer: A dose- and volume-response analysis”, *Rad. Oncol*, v. 91, pp. 360-368.
- PIERCE, S.M., RECHT, A., LINGOS, T.I., ABNER, A., VICINI, F., SILVER, B., HERZOG, A., HARRIS, J.R., 1992, “Long-term radiation complications following conservative surgery (CS) and radiation therapy (RT) in patients with early stage breast cancer”, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v. 23, pp. 915-923.
- POLACCI, M., BAKER, D.R., MANCINI, L., TROMBA, G., ZANINI, F., 2006, “Three-Dimensional Investigation of Volcanic Textures by X-Ray Microtomography and Implications for Conduit Processes”, *Geophysical Research Letters*, v. 33, pp. L13312.
- PRINS, M., 1984. “Trace elements analysis and element mapping by scanning x-ray fluorescence at Daresbury SRS”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, v. 222, pp. 324-328.
- QXAS (Quantitative X-ray Analysis System) software package, IAEA, Vienna, 1995
- RIDDLER, T.W., CALVARD, S., 1978, “Picture thresholding using an iterative selection method”, *IEEE Trans. System, Man and Cybernetics*, v. 8, pp. 630-632.

- SHAPEERO, L.G., DE VISSCHERE, P.J.L., VERSTRAETE, K.L. POFFYN, B., 2008, “Post-treatment complications of soft tissue tumours”, *European Journal of Radiology*, v. 69, pp. 209-221.
- SIMABUCO, S.M., “Emprego da fluorescência de raios X por dispersão de energia no estudo da dinâmica da vinhaça no solo. Tese de D.Sc., IPEN/CNEN, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- TESEI, L., CASSELER, F., DREOSSI, D., MANCINI, L., TROMBA, G., ZANINI, F., 2005, “Contrast-Enhanced X-Ray Microtomography of the Bone Structure Adjacent to Oral Implants”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 548, pp. 257-263.
- THURNER, P.J., WYSS, P., VOIDE, R., STAUBER, M., STAMPANONI, M., SENNHAUSER, U., MÜLLER, R., 2006, “Time-lapsed investigation of three-dimensional failure and damage accumulation in trabecular bone using synchrotron light”, *Bone*, v. 39, pp. 289-299.
- TZAPHLIDOU, M., SPELLER, R., ROYLE, G., GRIFFITHS, J., OLIVO, A., PANI, S., LONGO, R., 2005, “High Resolution Ca/P Maps of Bone Architecture in 3D Synchrotron Radiation Microtomographic Images”, *Applied Radiation and Isotopes*, v. 62, pp. 569-575.
- VAN GRIEKEN, R.E., MARKOWICZ, A.A., 2002, *Handbook of x ray fluorescence*. 2^a ed. New York, Marcel Dekker Inc.
- WANG, C., EISA, M.H. JIN, W., SHEN, H., MI, Y., GAO, J., ZHOU, Y., YAO, H., ZHAO, Y., 2008, “Age related elemental changes in bones”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, v. 266, 1619-1622.
- WERNLE, J.D., DAMRON, T.A., ALLEN, M.J., MANN, K.A., 2010, “Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model”, *J. Biomech*, v. 43, pp. 2738-2746.

ANEXO A

A.1 Imagens de microtomografia computadorizada (μ TC)

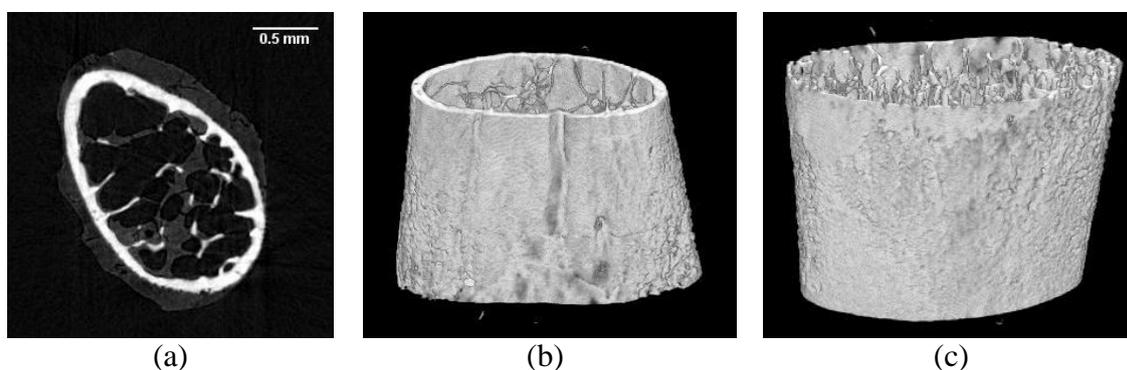


Figura A.1 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Contr-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.

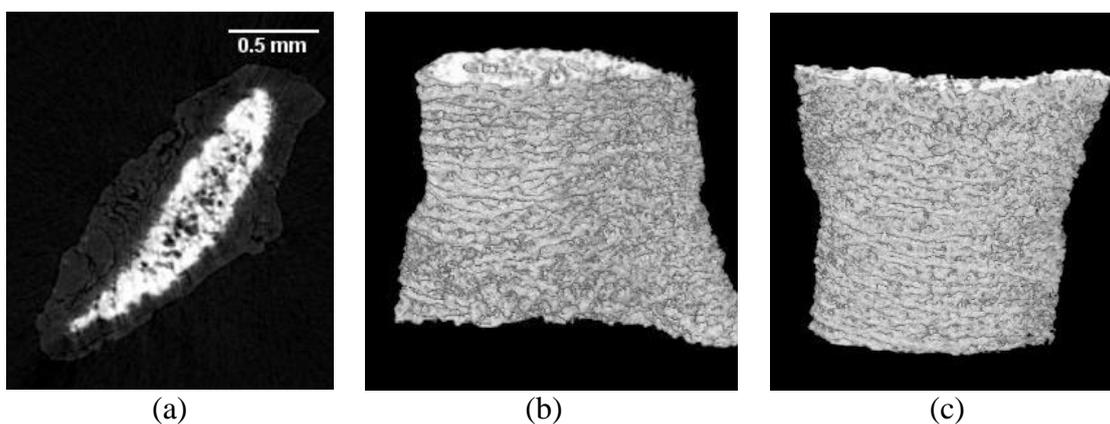


Figura A.2 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Contr-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.

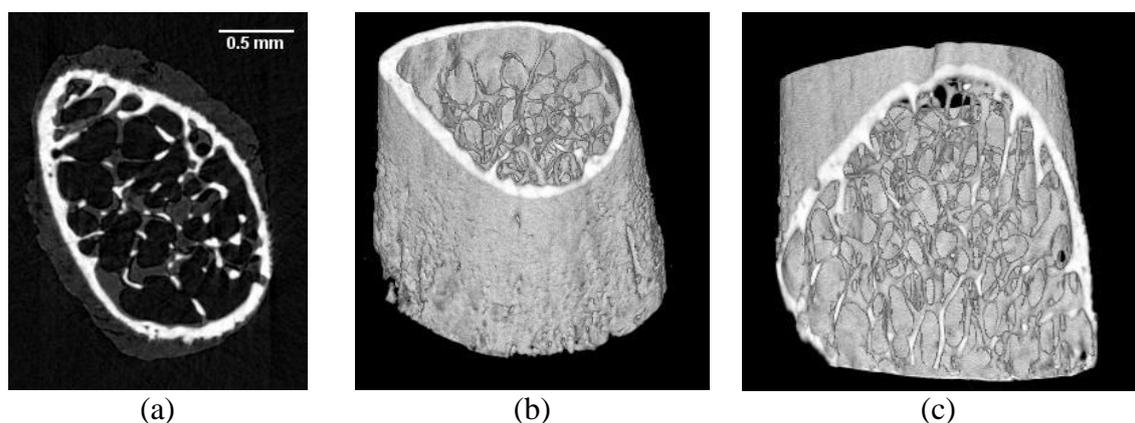
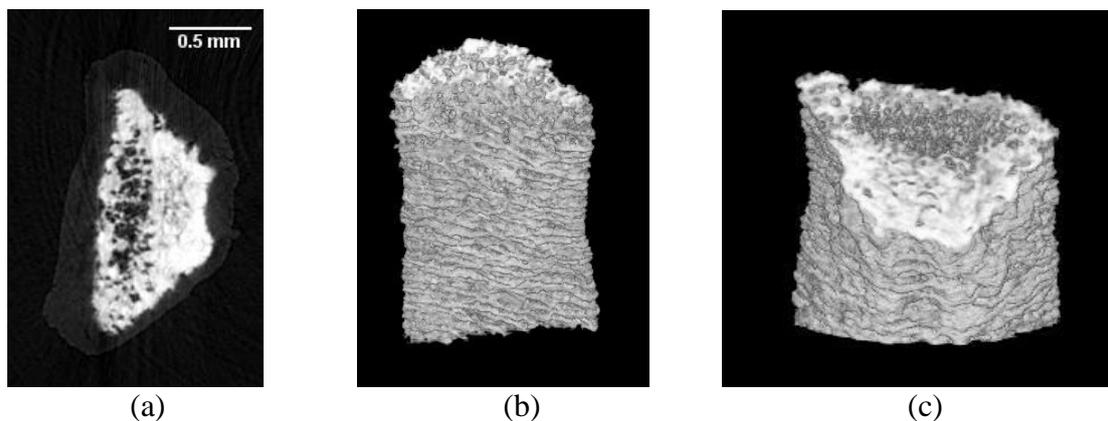
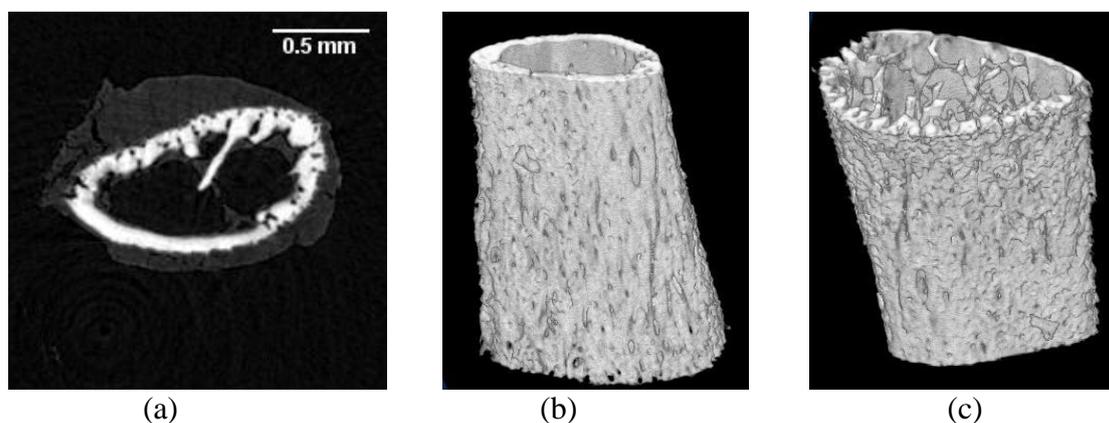


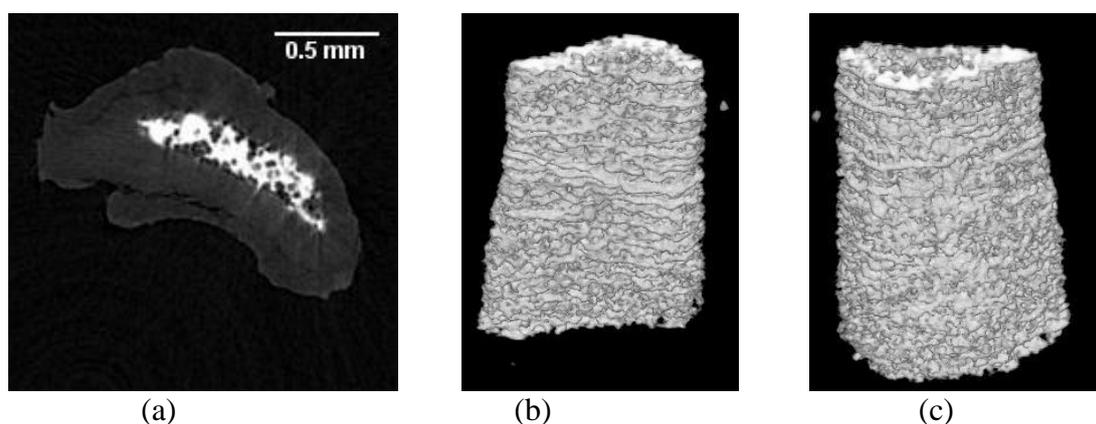
Figura A.3 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Elet-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.



(a) (b) (c)
Figura A.4 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Elet-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.



(a) (b) (c)
Figura A.5 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Fot-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.



(a) (b) (c)
Figura A.6 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Fot-1. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.

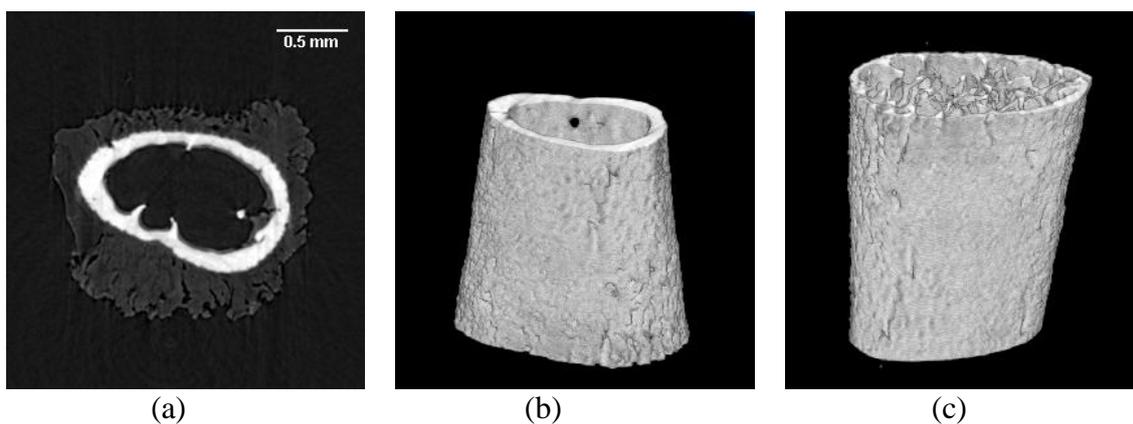


Figura A.7 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Contr-2. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.

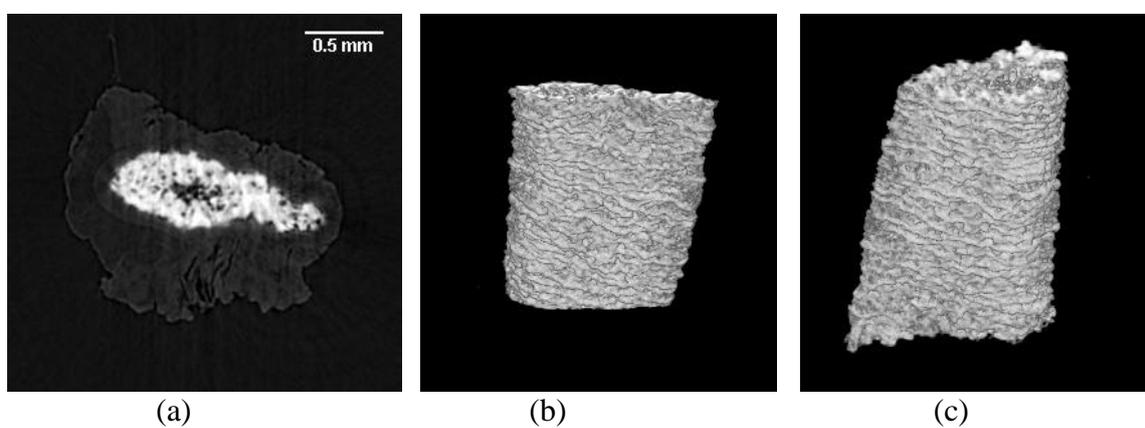


Figura A.8 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Contr-2. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.

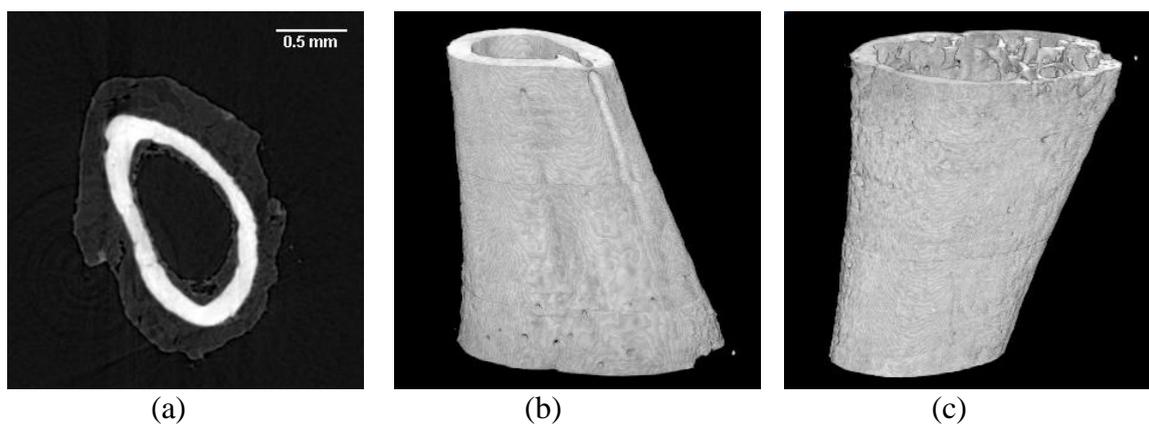


Figura A.9 – Microtomografia computadorizada de uma amostra dorsal do grupo Fot-2. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.

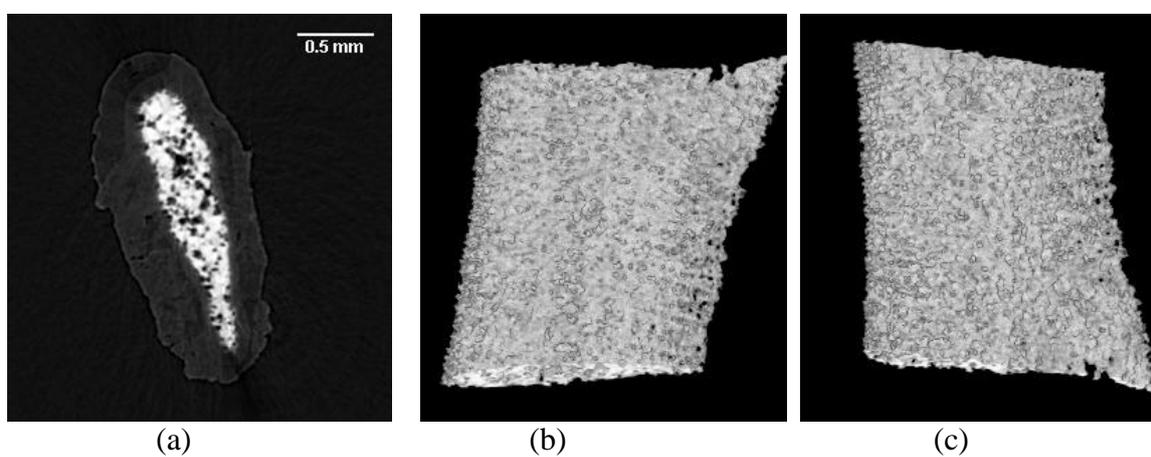


Figura A.10 – Microtomografia computadorizada de uma amostra ventral do grupo Fot-2. (a) slice central; (b) e (c) imagens 3D em diferentes orientações.

A.2 Imagens de microfluorescência de raios X (μ XRF)

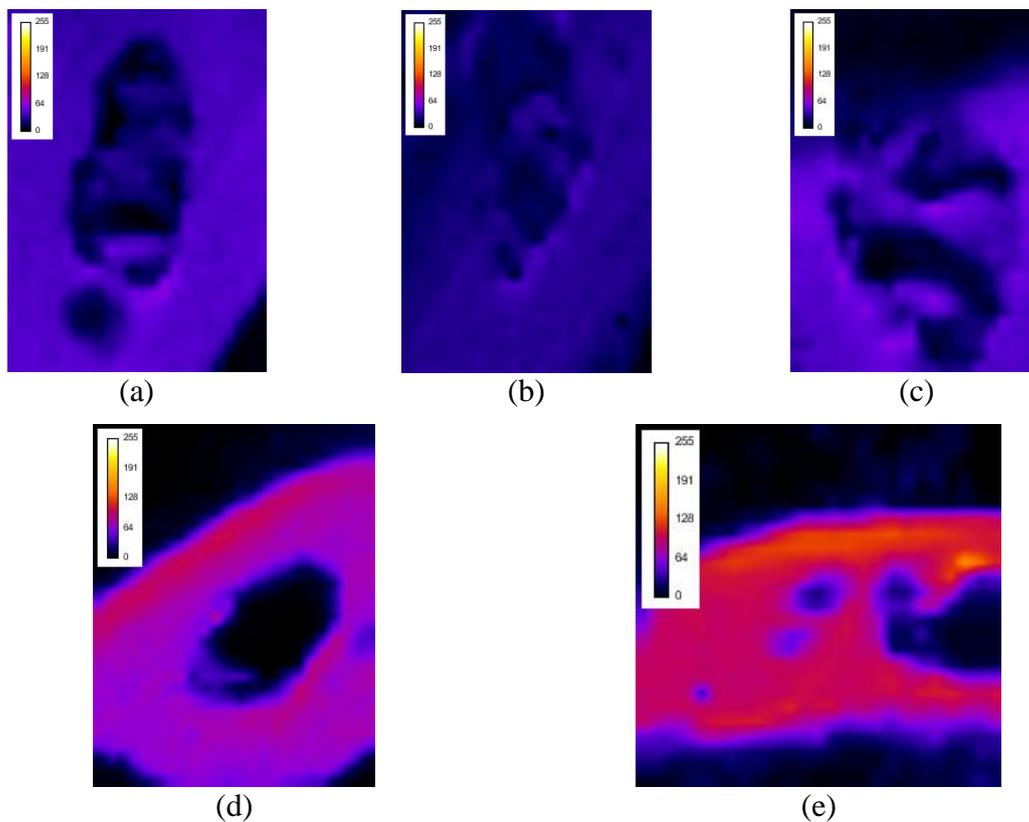


Figura A.11 – Distribuição de Ca nas amostras dorsais de controle (Contr-2).

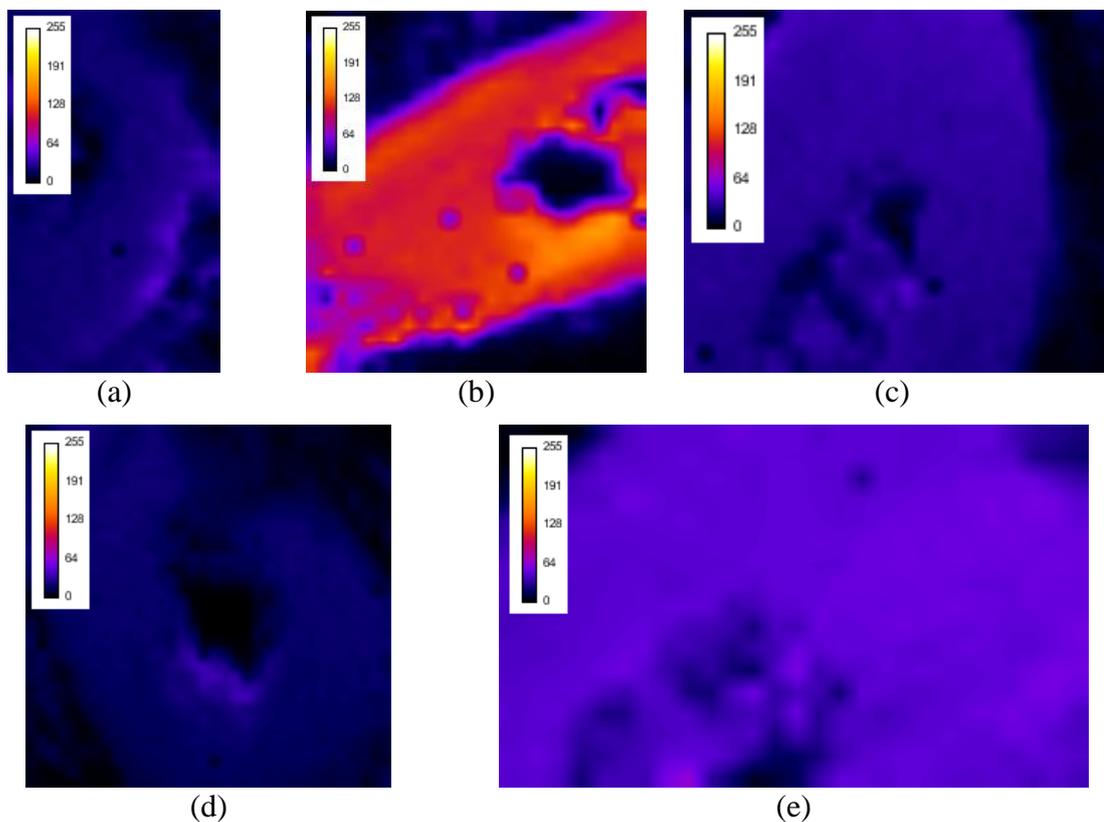


Figura A.12 – Distribuição de Ca nas amostras dorsais irradiadas (Fot-2).

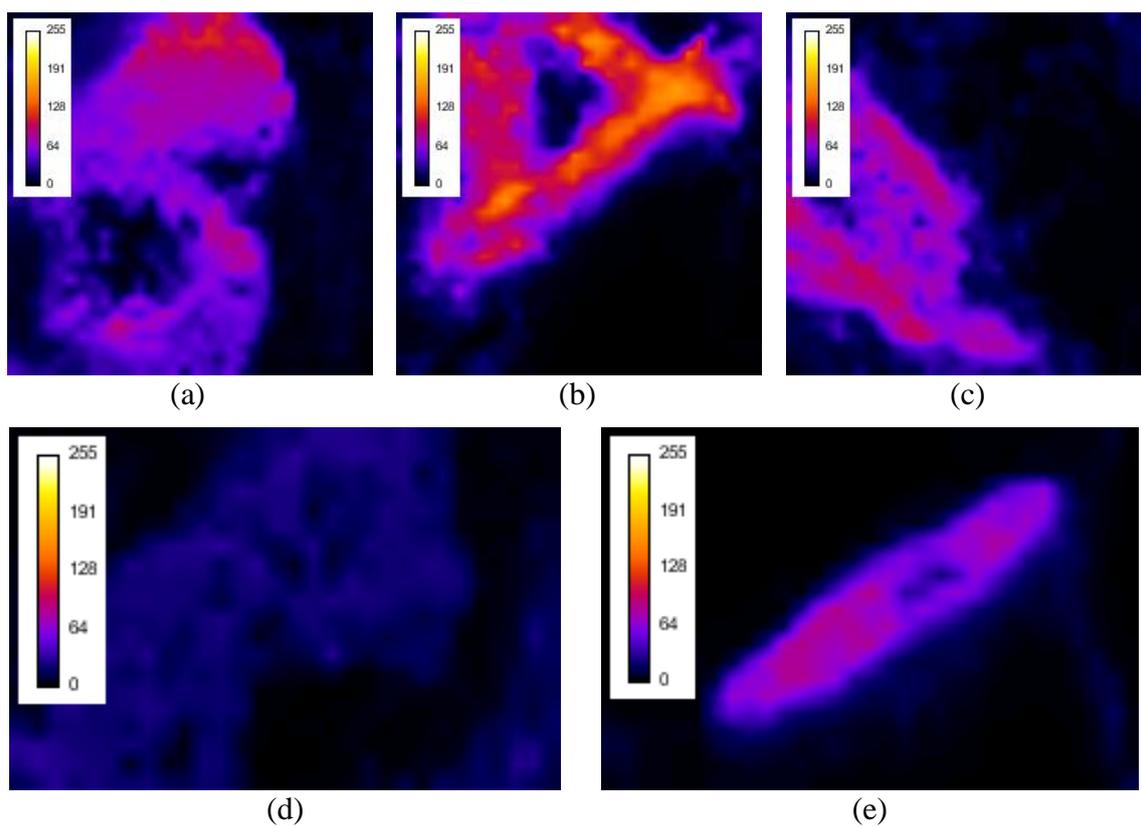


Figura A.13 – Distribuição de Ca nas amostras ventrais de controle (Contr-2).

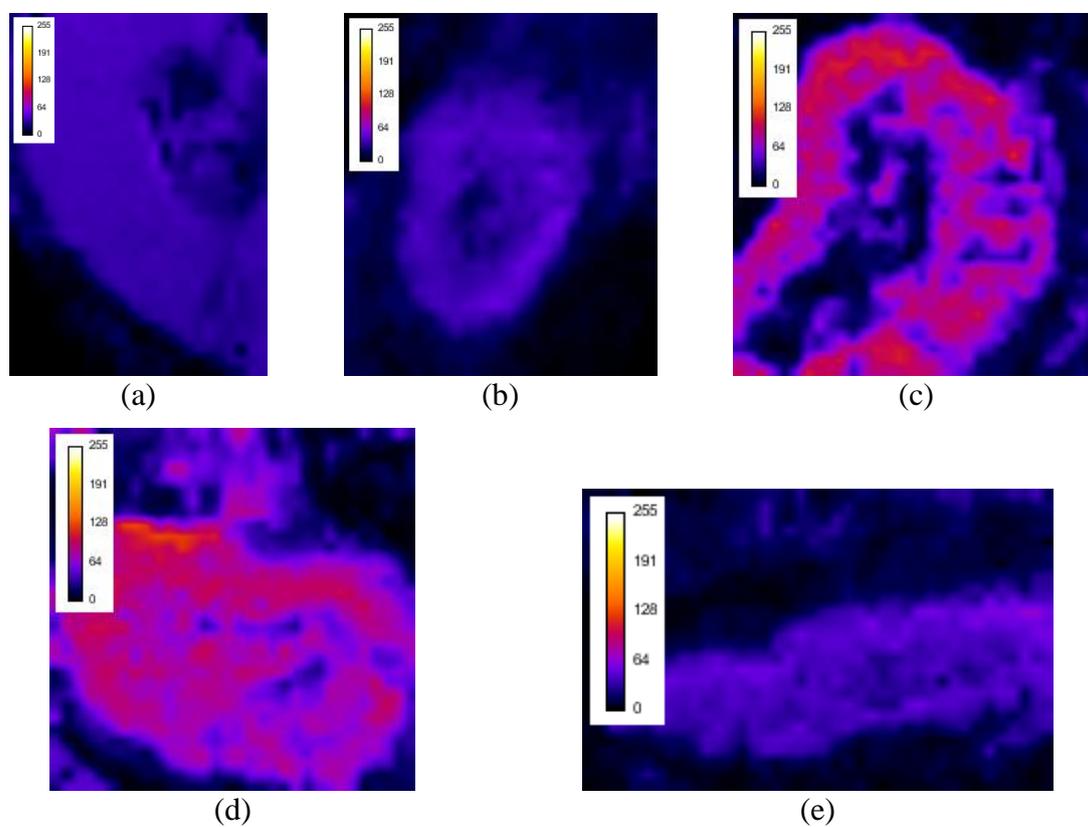


Figura A.14 – Distribuição de Ca nas amostras ventrais irradiadas (Fot-2).

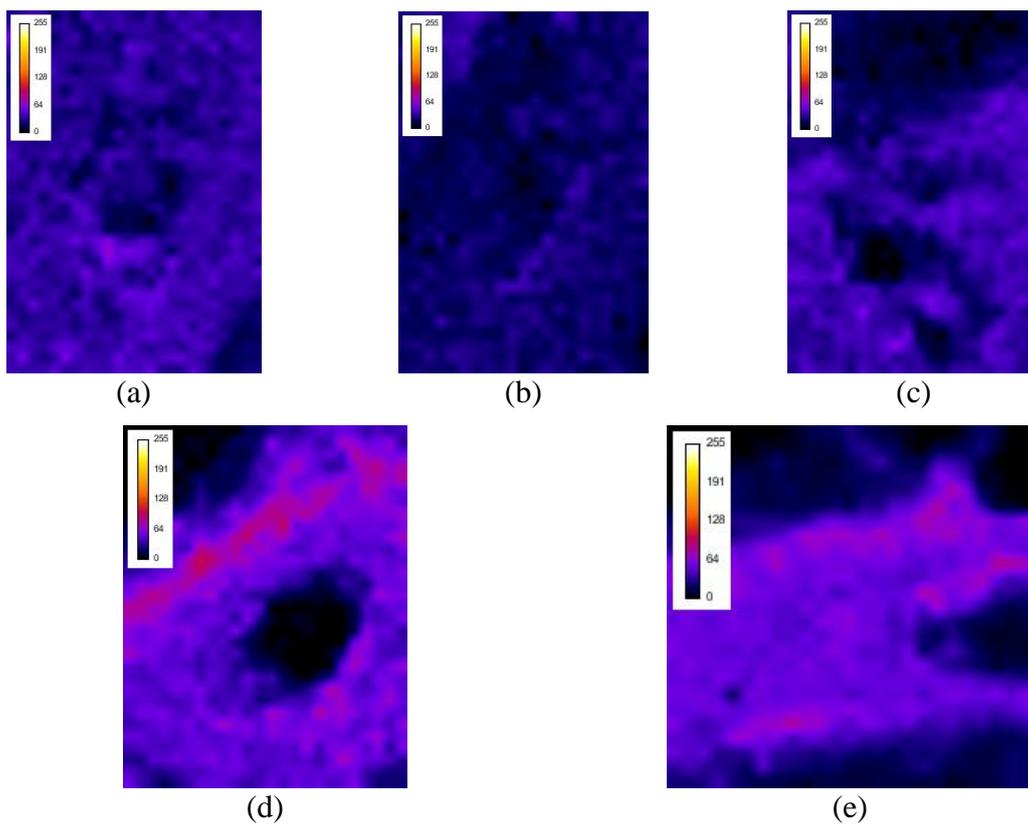


Figura A.15 – Distribuição de K nas amostras dorsais de controle (Contr-2).

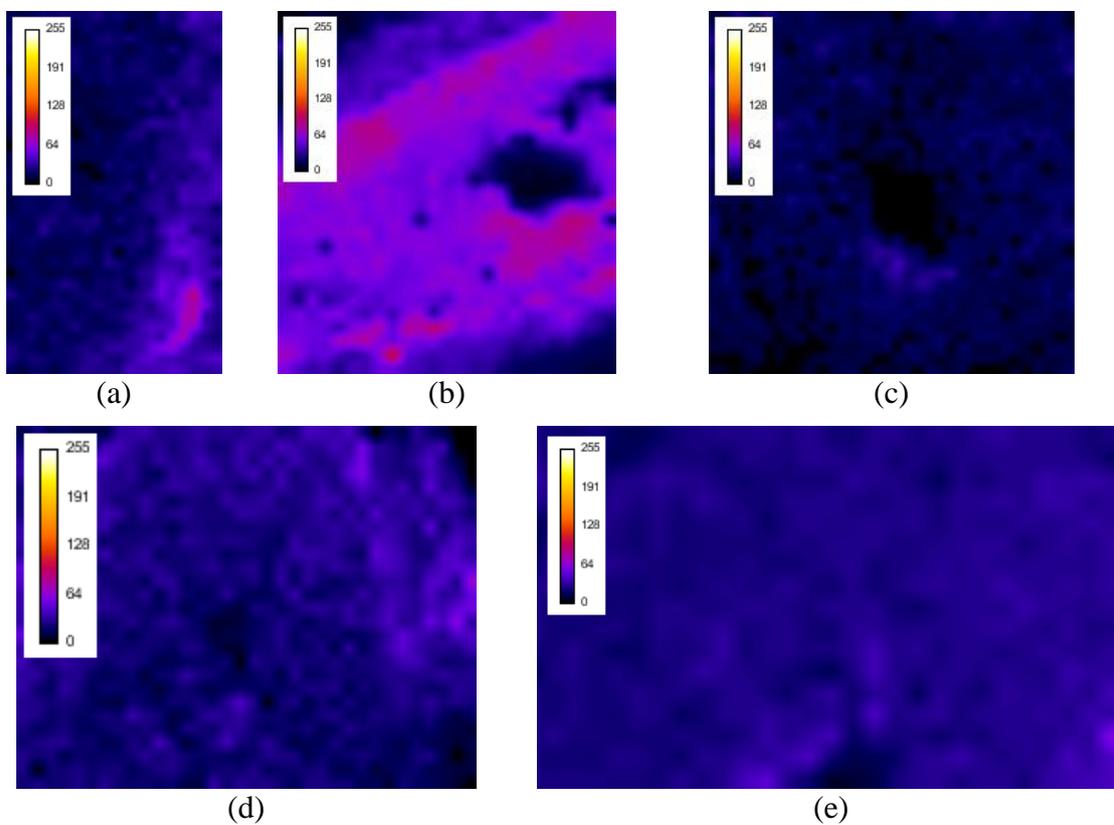


Figura A.16 – Distribuição de K nas amostras dorsais irradiadas (Fot-2).

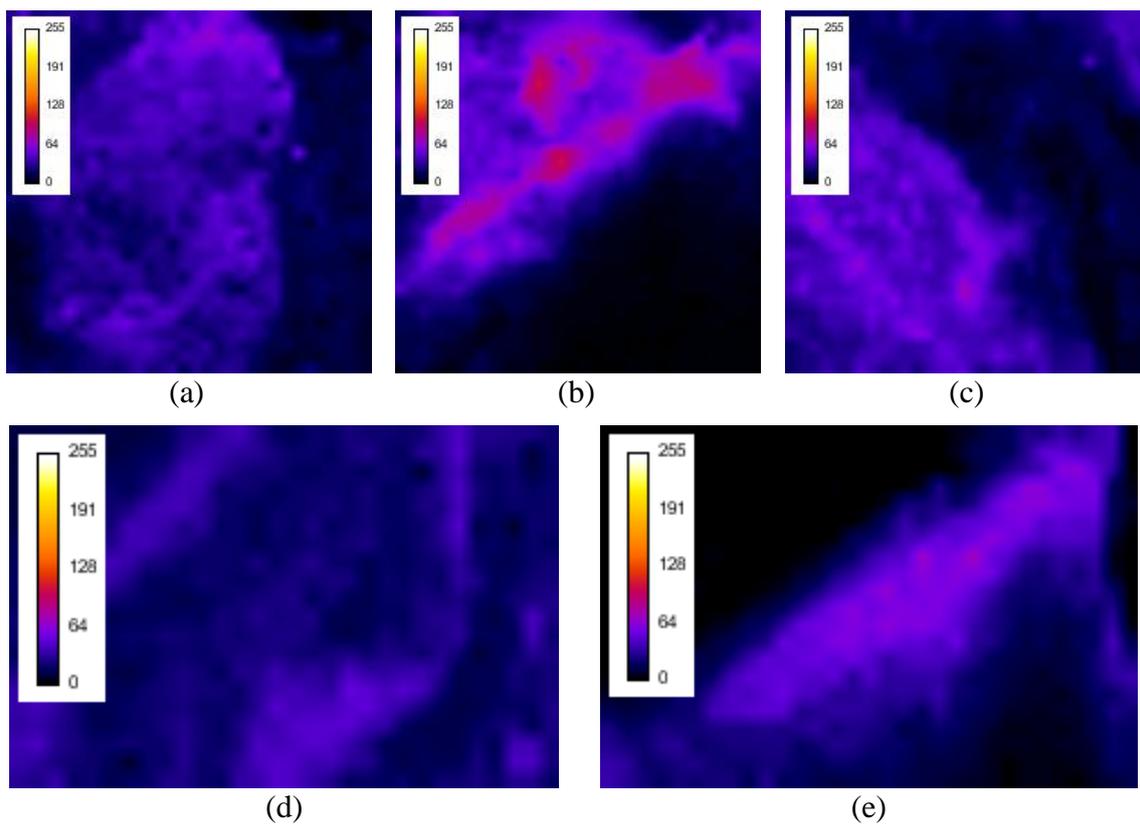


Figura A.17 – Distribuição de K nas amostras ventrais de controle (Contr-2).

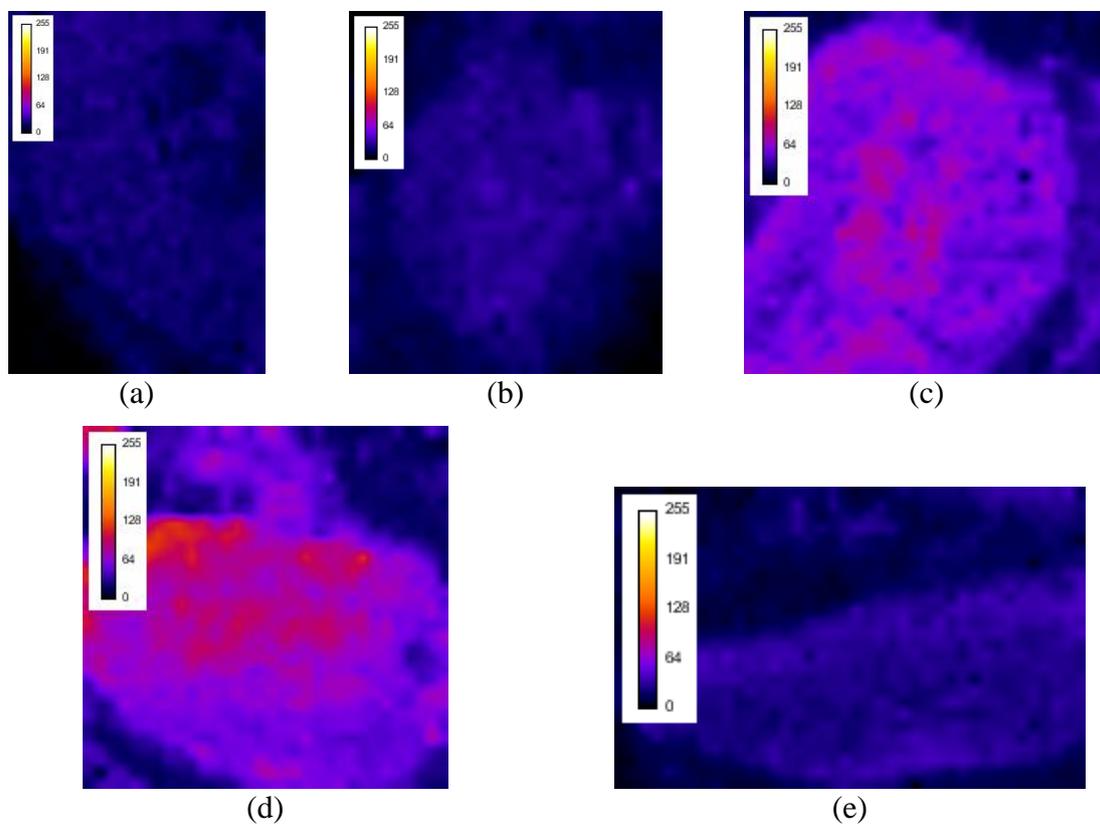


Figura A.18 – Distribuição de K nas amostras ventrais irradiadas (Fot-2).

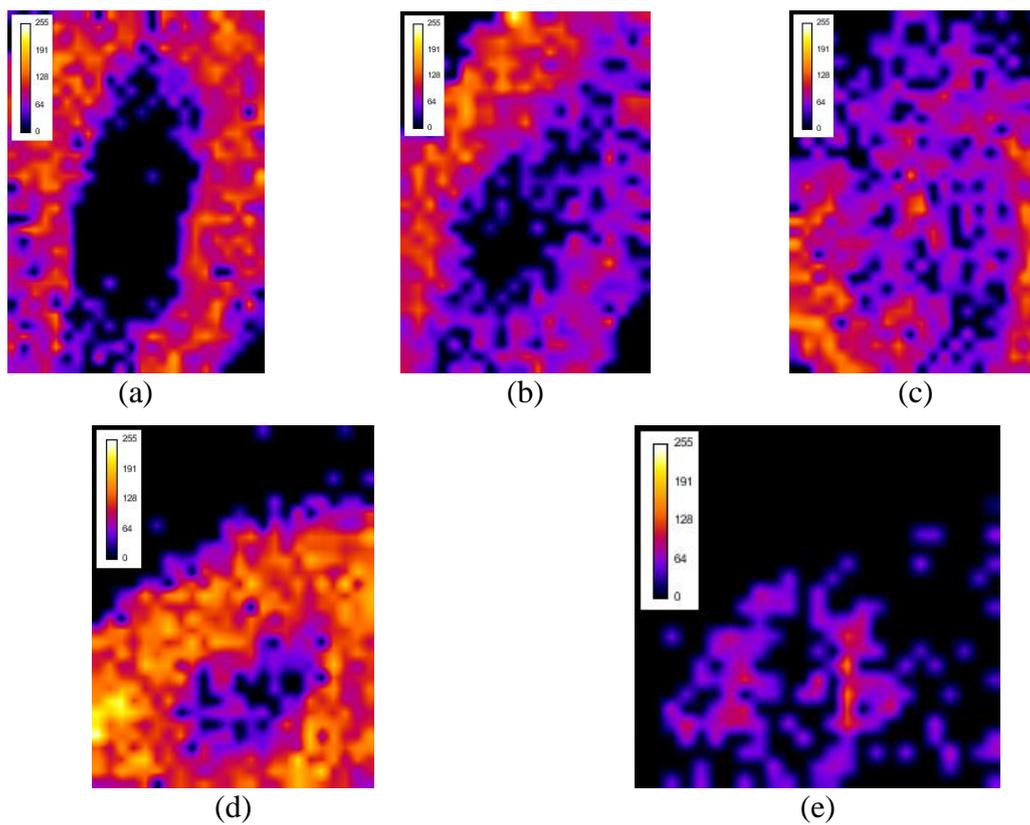


Figura A.19 – Distribuição de Sr nas amostras dorsais de controle (Contr-2).

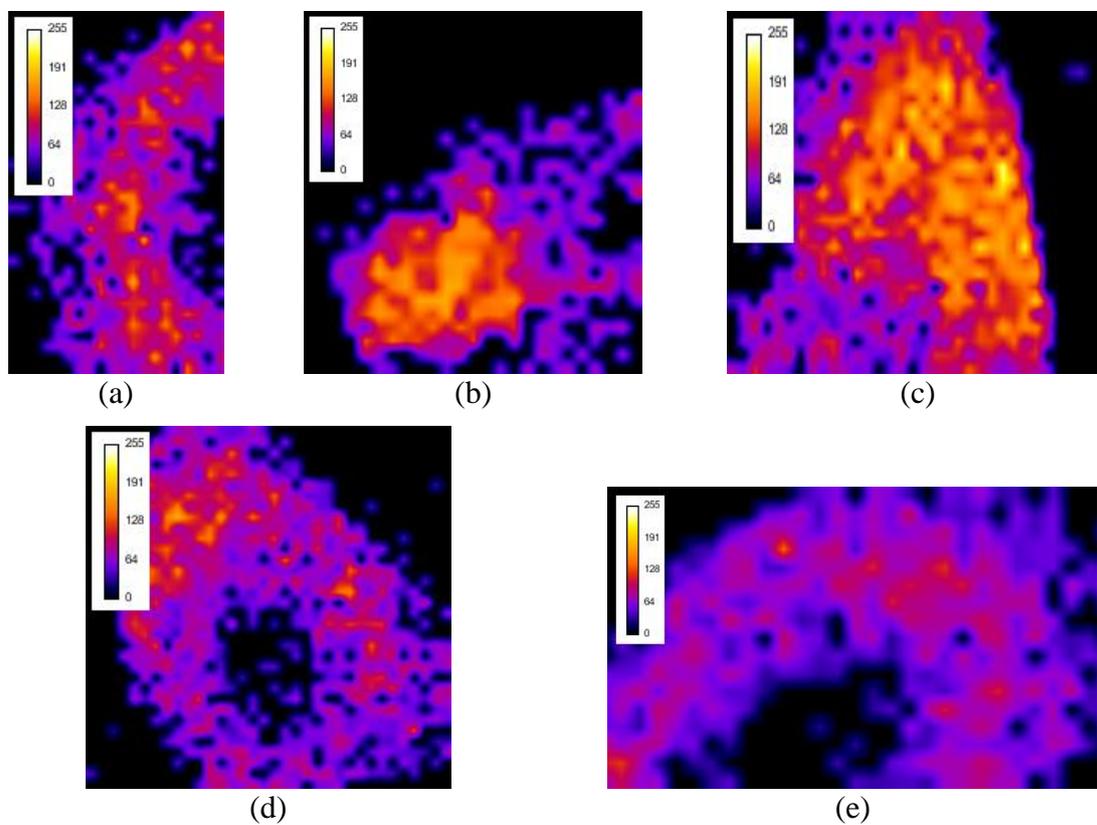


Figura A.20 – Distribuição de Sr nas amostras dorsais irradiadas (Fot-2).

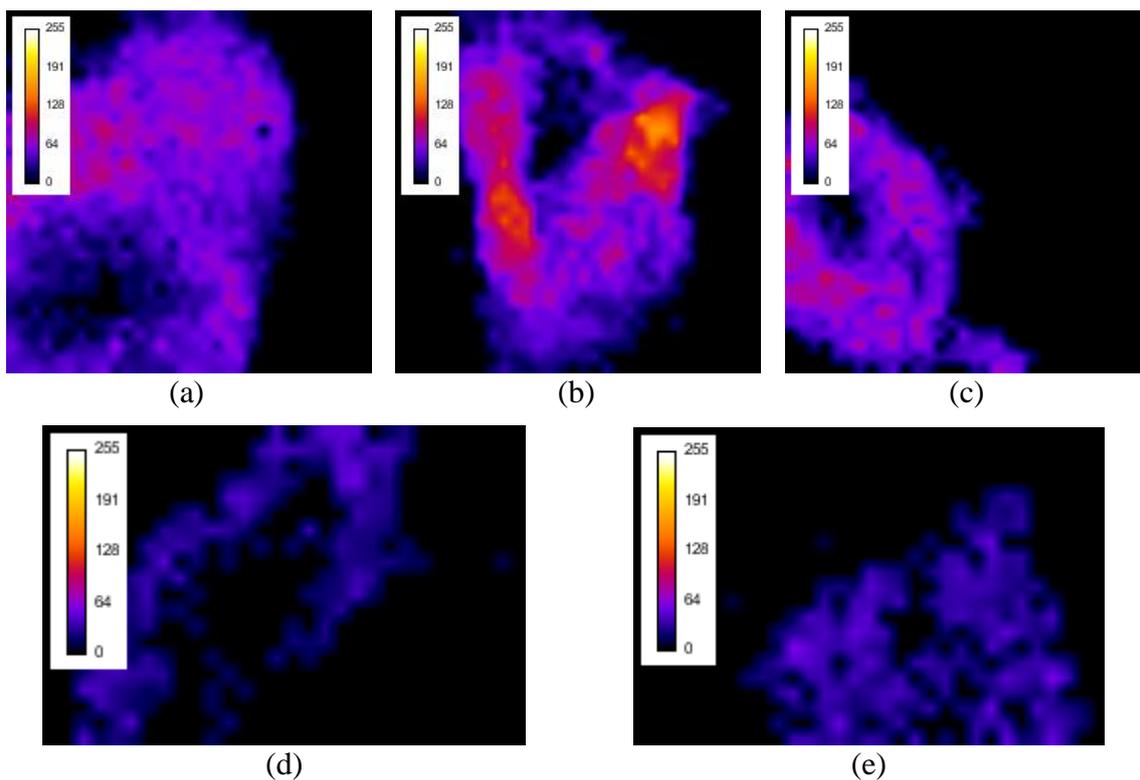


Figura A.21 – Distribuição de Sr nas amostras ventrais de controle (Contr-2).

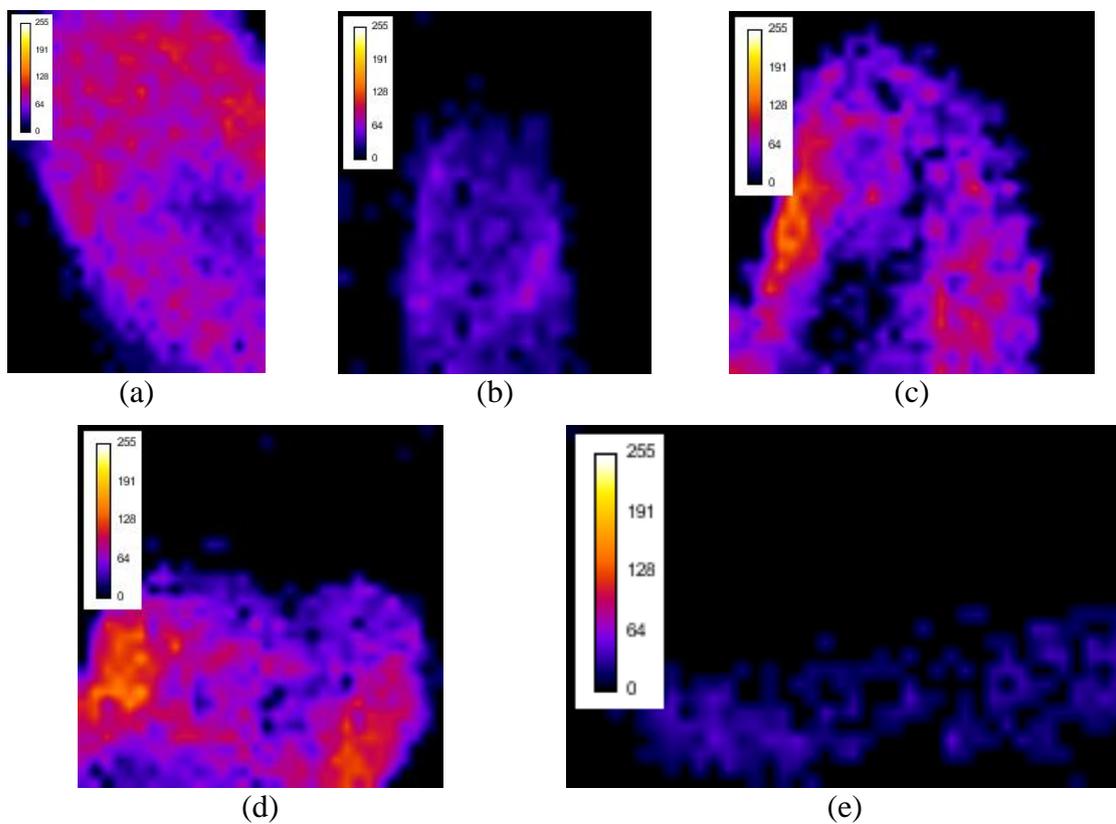


Figura A.22 – Distribuição de Sr nas amostras ventrais irradiadas (Fot-2).

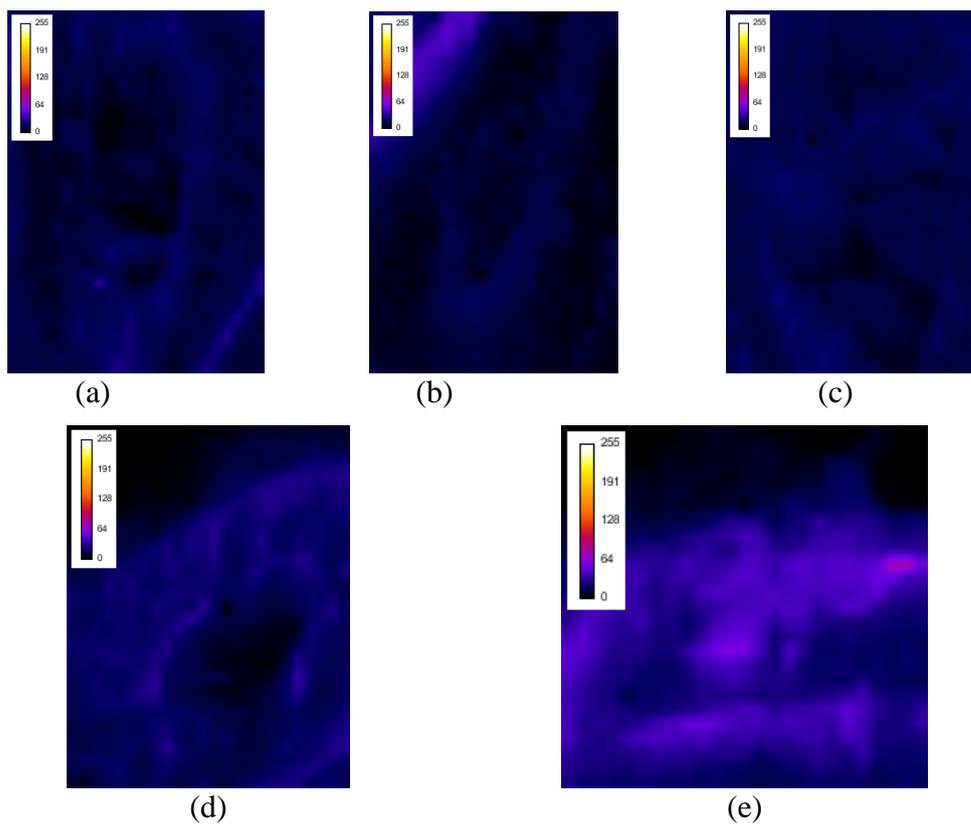


Figura A.23 – Distribuição de Zn nas amostras dorsais de controle (Contr-2).

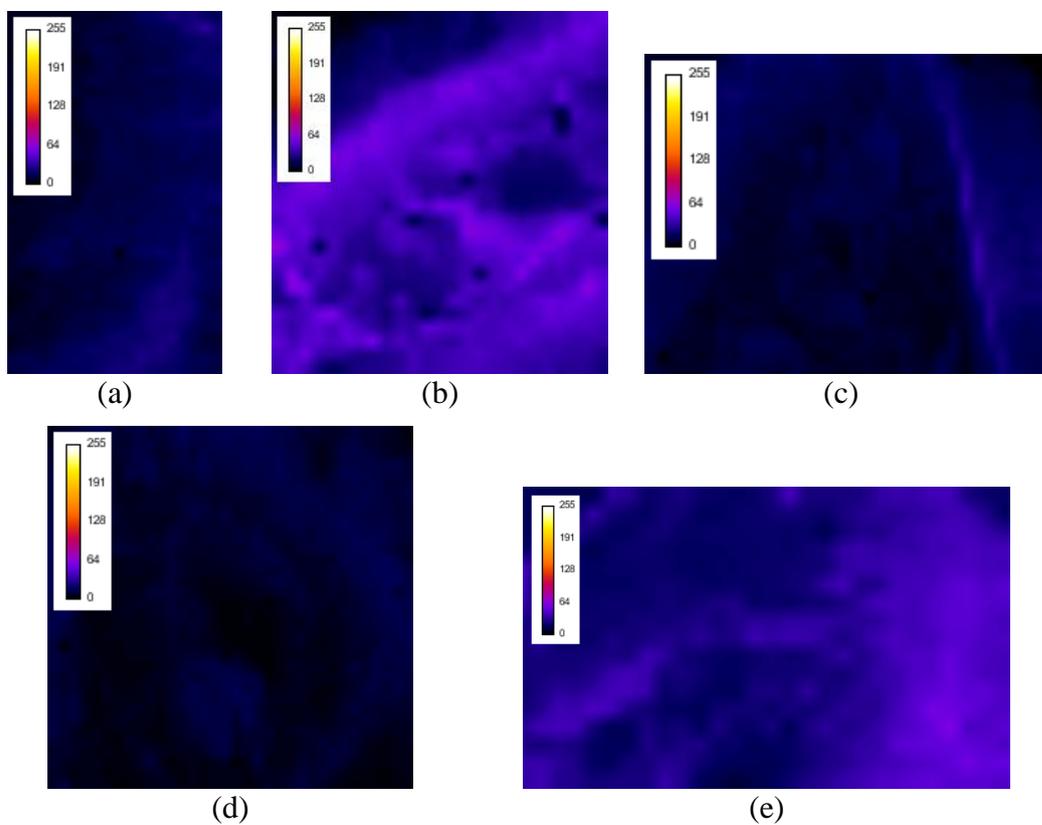


Figura A.24 – Distribuição de Zn nas amostras dorsais irradiadas (Fot-2).

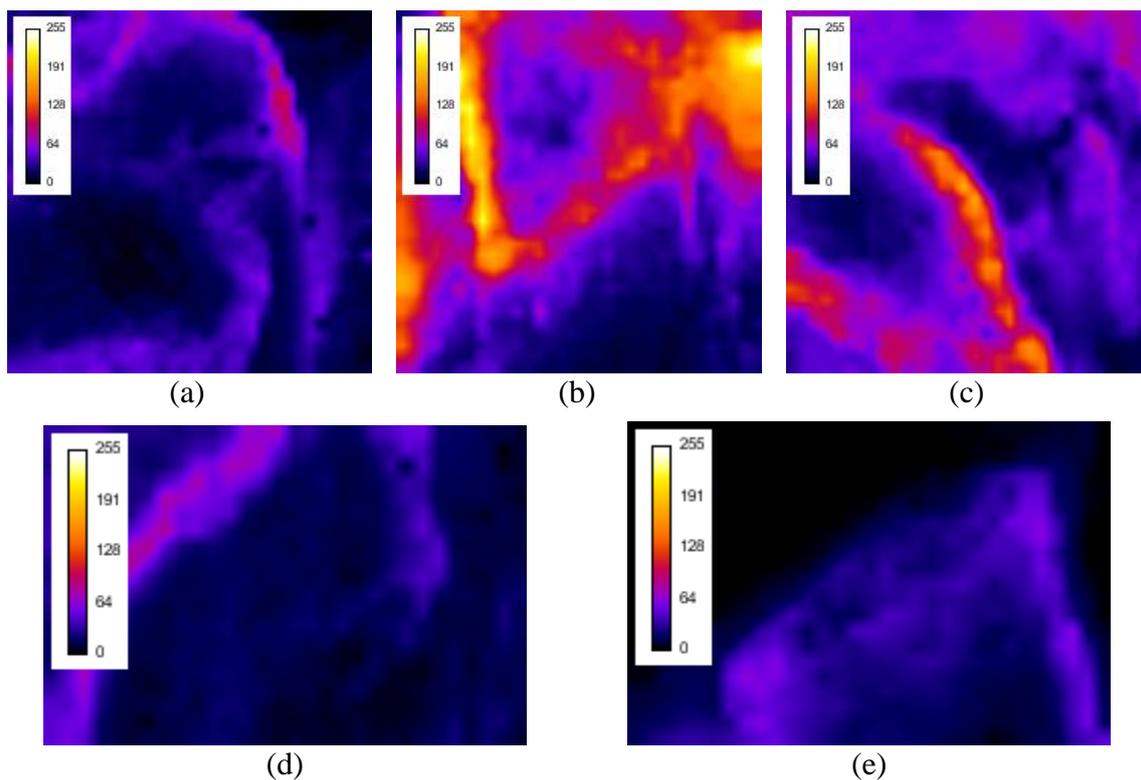


Figura A.25 – Distribuição de Zn nas amostras ventrais de controle (Contr-2).

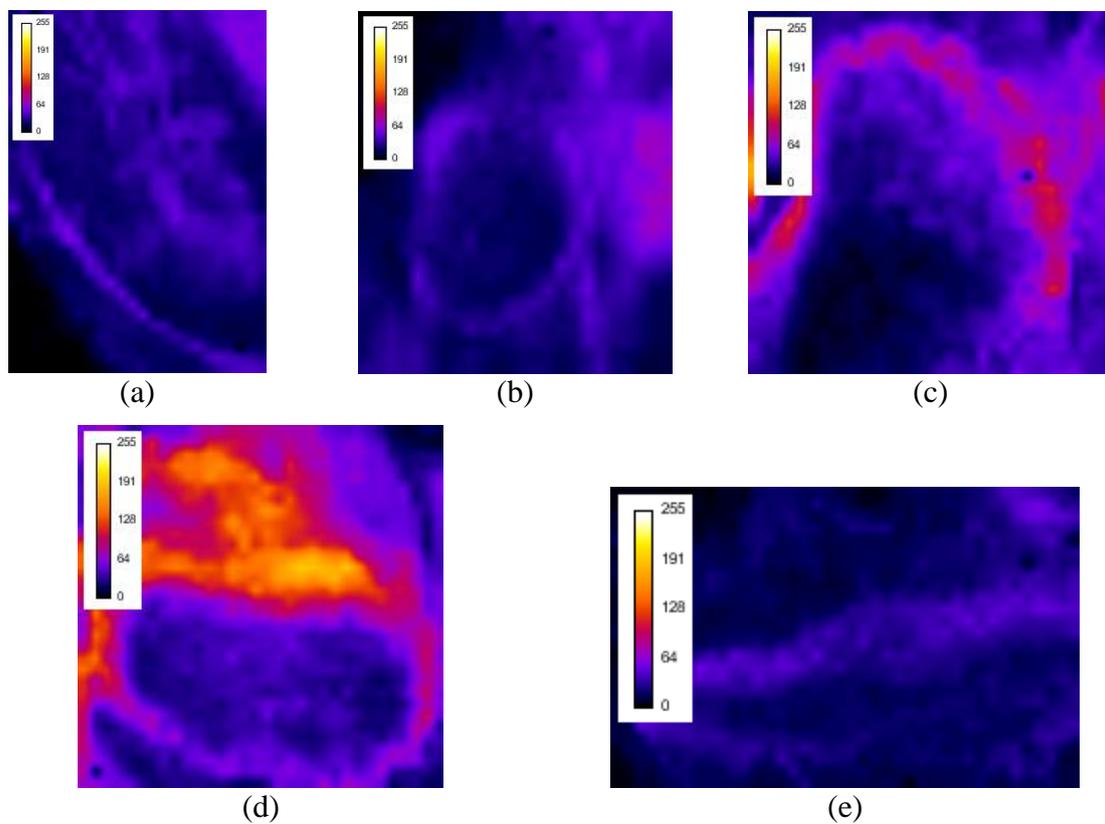


Figura A.26 – Distribuição de Zn nas amostras ventrais irradiadas (Fot-2).

ANEXO B