



MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA
POR LUZ SÍNCROTRON PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE
POLIQUIMIOTERÁPICOS EM FÊMURES DE RATAS WISTAR

Rita de Cássia Polito Vita Alessio

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

Orientadores: Delson Braz

Liebert Parreiras Nogueira

Rio de Janeiro

Março de 2015

MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA
POR LUZ SÍNCROTRON PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE
POLIQUIMIOTERÁPICOS EM FÊMURES DE RATAS WISTAR

Rita de Cássia Polito Vita Alessio

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. Liebert Parreiras Nogueira, D.Sc

Prof^a. Regina Cély Rodrigues Barroso, D.Sc.

Prof. Edimilson Monteiro de Souza, D.Sc.

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

Dra. Camila Salata, D.Sc.

Prof. Admir Xavier da Silva, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ-BRASIL

MARÇO DE 2015

Alessio, Rita de Cássia Polito Vita

Microtomografia Computadorizada por luz síncrotron para avaliação dos efeitos de poliquimioterápicos em fêmures de ratas wistar/ Rita de Cássia Polito Vita Alessio. -Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XVII, 100 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador(es): Delson Braz

Liebert Parreiras Nogueira

Tese (doutorado) – UFRJ / COPPE / Programa de Engenharia Nuclear, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 88-100

1. Microtomografia computadorizada. 2. Quantificação óssea. 3. Luz Síncrotron. 4. Quimioterapia. I. Braz, Delson *et al.*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Nuclear. III. Título.

*“Há uma força motriz mais poderosa
que o vapor, a eletricidade e a
energia atômica: a vontade.”*

Albert Einstein

*Aos meus familiares, em especial
minha mãe Isa Rita e minha tia Iná.*

*Ao meu marido Leonardo Rodrigues,
pelo grande apoio e compreensão
durante todo o percurso.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo.

Gostaria de agradecer ao Professor Liebert Parreiras Nogueira pela orientação neste trabalho, pela paciência e atenção, por toda disponibilidade e incentivo.

À Professora Regina Cély, pela paciência e atenção, supervisão e pela credibilidade de trabalho. Pelo carinho e incentivo 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.

À Camila Salata, pela ajuda com os animais e pelas discussões referentes à parte biológica deste trabalho.

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

A todos os meus familiares pela compreensão por todos os momentos que estive ausente.

As minhas amigas, que sempre estiveram presentes, apoiando e ajudando.

Ao Laboratório de luz síncrotron ELETTRA.

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
POR LUZ SÍNCROTRON PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE
POLIQUIMIOTERÁPICOS EM FÊMURES DE RATAS WISTAR

Rita de Cássia Polito Vita Alessio

Março/ 2015

Orientadores: Delson Braz

Liebert Parreiras Nogueira

Programa: Engenharia Nuclear

O Câncer é o crescimento desordenado de células, que invadem os tecidos e órgãos. Para o controle e tratamento do câncer, uma das técnicas mais utilizadas é a quimioterapia, e é inevitável que durante o tratamento, os tecidos saudáveis sejam afetados. Um dos efeitos da quimioterapia é a indução da amenorréia, com uma consequente diminuição de estrogênio, que pode ocasionar alterações ósseas, semelhantes às apresentadas em pacientes com osteoporose. O objetivo deste trabalho foi realizar a quantificação morfométrica, através da microtomografia computadorizada utilizando a luz síncrotron, de índices referentes à região trabecular (cabeça do fêmur) e a região cortical (diáfise do fêmur), de ratas tratadas com diferentes poliquimioterápicos, utilizados no tratamento de câncer de mama, para a análise de possíveis alterações ósseas devido a estes tratamentos. Todas as imagens foram obtidas na linha SYRMEP no laboratório de luz síncrotron ELETTRA, na Itália. Os índices morfométricos analisados para a parte trabecular foram: BV/TV (razão volume ósseo volume total), Tb.Th (espessura trabecular média), Tb.Sp (espaçamento trabecular médio), Tb.N (densidade trabecular) e SMI (índice modelo de estrutura). Para a parte cortical foram calculados os índices Por.Ct (razão volume de poros-volume total), Por.Th (espessura média dos poros), Por.Sp (separação média dos poros) e Por.N (densidade de poros). Os resultados revelaram alterações ósseas significativas de BV/TV e SMI para a região trabecular da cabeça assim como para todos os parâmetros morfométricos referentes a região cortical da diáfise do fêmur.

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 TO EVALUATE
EFFECTS OF POLYCHEMOTHERAPY DRUGS ON FEMURS OF WISTAR RATS

Rita de Cássia Polito Vita Alessio

March/ 2015

Advisors: Delson Braz
Liebert Parreiras Nogueira

Department: Nuclear Engineering

Cancer is the uncontrolled growth of cells that invade tissues and organs. For the control and treatment of cancer, one of the most widely used techniques is chemotherapy, and it is inevitable that during treatment, the healthy tissues are affected. One of the effects of chemotherapy is the induction of amenorrhea, with a consequent decrease in production of estrogen, which should cause bone changes similar to those presented in patients with osteoporosis. The aim of this study was to perform morphometric quantification using synchrotron light computed microtomography, of the indices referring to the trabecular (femoral head) and cortical bones (femoral diaphysis) of rats treated with different polychemotherapy drugs used on the treatment of breast cancer, in order to analyze possible bone changes due to these treatments. The images were obtained on Medical Physics (SYRMEP) beamline at the ELETTRA synchrotron laboratory located in Italy. Morphometric indices analyzed for trabecular bone were: BV/TV (bone volume fraction), Tb.Th (average trabecular thickness), Tb.Sp (average trabecular spacing), Tb.N (trabecular density) and SMI (structure model index). For the cortical indices they were: Por.Ct (pore volume to total volume ratio), Por.Th (average pore thickness), Por.Sp (average pore separation) and Por.N (pore density). The results showed significant bone changes of BV/TV and SMI on the trabecular region of the head of the femur as well as for all morphometric parameters for the cortical region of the femoral diaphysis.

Sumário

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	6
1.2 Motivação	7
CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	8
2.1 A Tomografia Computadorizada	8
2.2 A Reconstrução de Imagens Tomográficas	9
2.2.1 Projeções.....	12
2.2.2 Teorema da Projeção de Fourier.....	16
2.2.3 Reconstrução Por Retroprojeção 2D	20
2.3 Tecido Ósseo	25
2.3.1 Processo de Remodelação Óssea.....	27
2.4 Segmentação e Quantificação dos Dados Tomográficos	27
2.4.1 Cálculo dos Parâmetros referentes à região Trabecular	31
2.4.2 Cálculo dos Parâmetros referentes à região Cortical.....	36
2.5 Tratamento Estatístico.....	37
2.5.1 Testes de Hipóteses	37
2.5.2 Hipótese nula e Hipótese alternativa	38
2.5.3 Erros do tipo I e II	38
2.5.4 Nível de significância e p-valor.....	38
2.5.5 Testes de Normalidade	39
2.5.5.1 Kolmogorov-Smirnov.....	39

2.5.6 Testes Paramétricos	39
2.5.6.1 Teste t de Student para duas amostras independentes	40
2.5.6.2 Análise de Variância (ANOVA).....	40
2.6 Produção de Luz Síncroton.....	41
2.7 Câncer de Mama (CM).....	43
2.7.1 Tratamento cirúrgico para o CM	44
2.7.2 Hormonioterapia.....	44
2.7.3 Radioterapia.....	45
2.7.4 Quimioterapia	46
2.7.5 Menopausa, diminuição do hormônio estrogênio e seu efeito no osso	48
CAPÍTULO 3 - MATERIAS E MÉTODOS	51
3.1 Animais utilizados e preparação das amostras	51
3.2 Microtomografia computadorizada	53
3.2.1 SYRMEP	53
3.2.1.1 Sistema de Detecção com Feixe Policromático.....	53
3.2.1.2 Sistema de Detecção com Feixe Monocromático.....	54
3.3 Aquisição das Tomografias	56
3.4 Reconstrução das Imagens Tomográficas	58
3.5 Quantificação das Amostras de Osso	60
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
4.1 Grupo Tratado G1 (docetaxel+ciclofosfamida - TC) x Controle - Região: Cabeça do Fêmur	63

4.1.1- Imagens	63
4.1.2- Quantificação Histomorfométrica (Osso Trabecular)	67
4.2 Grupo Tratado (docetaxel+ciclofosfamida - TC) x Grupo Tratado (doxorrubicina+ciclofosfamida - AC) x Controle - Região: Diáfise do Fêmur	73
4.2.1- Imagens	73
4.2.2- Quantificação dos Parâmetros Morfométricos (Osso Cortical)	77
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO.....	83
5.1 Trabalhos Futuros.....	85
REFERÊNCIAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Princípio da formação da imagem microtomográfica (ANDREUCCI, 2006).	9
Figura 2.2: Representação dos coeficientes de atenuação em uma seção transversal. ...	13
Figura 2.3: Representação esquemática do raio soma (KAK,1987).....	14
Figura 2.4: Projeção Paralela.....	16
Figura 2.5: Pontos, da transformada bidimensional, obtidos a partir da transformada de várias projeções.	19
Figura 2.6: Filtro Rampa.	22
Figura 2.7: Filtros utilizados na reconstrução (OLIVEIRA, 2002).....	23
Figura 2.8: Composição do osso (Adaptado de Netter, 2004).	25
Figura 2.9: Histograma de uma imagem tomográfica 2D de 8-bit (NOGUEIRA, 2011).	29
Figura 2.10: Imagem binária da diáfise do fêmur do rato.	30
Figura 2.11: Marching Cube (LORENSEN & CLINE, 1987).	32
Figura 2.12: Triangulação de 14 padrões (LORENSEN & CLINE, 1987).....	33
Figura 2.13: Numeração do cubo (LORENSEN & CLINE, 1987).....	34
Figura 2.14: a) Estrutura em forma de placa b) Estrutura em forma de haste (DING et al., 2000).....	36
Figura 2.15: Produção de Luz Síncrotron (NOGUEIRA, 2011).	42
Figura 3.1: Cabeça do fêmur - região investigada referente à região trabecular (ALESSIO et al., 2014).	52
Figura 3.2: Diáfise do fêmur - região investigada referente à região cortical.	53
Figura 3.3: Esquema funcional da linha de luz SYRMEP.	54
Figura 3.4: Aparato experimental da linha SYRMEP do laboratório ELETTRA, para o feixe monocromático.	55
Figura 3.5: 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.	56

Figura 3.6: (a) Submenu para seleção do número de imagens a serem adquiridas. (b) Submenu para seleção do passo angular e destinação dos arquivos gerados.	56
Figura 3.7: (a) Imagem da amostra. (b) Imagem flat. (c) Imagem dark (d) imagem normalizada.	58
Figura 3.8: (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 e o filtro usado.	59
Figura 3.9: Região selecionada na imagem para quantificação da região trabecular da cabeça do fêmur.....	60
Figura 3.10: Regiões selecionadas na imagem binarizada para quantificação da região cortical da diáfise do fêmur.	61
Figura 4.1: Slices de diferentes profundidades da região da cabeça do fêmur do grupo controle (G0).....	64
Figura 4.2: Slices de diferentes profundidades da região da cabeça do fêmur do grupo G1, tratado com poliquimioterápico (docetaxel + ciclofosfamida).....	65
Figura 4.3: Imagem 2D (seção horizontal) da cabeça do fêmur a) grupo controle (G0) e b) grupo tratado (G1).....	66
Figura 4.4: Imagens 3D em vários ângulos da região utilizada na quantificação histomorfométrica de uma amostra do grupo controle.....	67
Figura 4.5: Imagens 3D em vários ângulos da região utilizada na quantificação histomorfométrica de uma amostra do grupo tratado.....	67
Figura 4.6: Gráfico dos valores de BV/TV referente à cabeça do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a** ($p < 0,01$).	68
Figura 4.7: Gráfico dos valores de Tb.Th referente à cabeça do fêmur.	69
Figura 4.8: Gráfico dos valores de Tb.Sp referente à cabeça do fêmur.	70
Figura 4.9: Gráfico dos valores de Tb.N referente à cabeça do fêmur.....	70
Figura 4.10: Gráfico dos valores de SMI referente à cabeça do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a* ($p < 0,05$).	72
Figura 4.11: a) Imagens 3D do volume b) Imagens 3D do sistema de canais de uma amostra do grupo controle.	74
Figura 4.12: a) Imagens 3D do volume b) Imagens 3D do sistema de canais de uma amostra do grupo tratado G1.	75

Figura 4.13: a) Imagens 3D do volume b) Imagens 3D do sistema de canais uma amostra do grupo tratado G2	75
Figura 4.14: Imagens 3D de três diferentes ângulos do sistema de canais (poros) da região utilizada na quantificação da diáfise do fêmur de uma amostra dos três grupos: a) grupo controle; b) grupo G1 (TC) e c) grupo G2 (AC).	76
Figura 4.15: Gráfico dos valores de Por.Ct referente a diáfise do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a*** ($p < 0,0001$).	78
Figura 4.16: Gráfico dos valores de Por.Th referente a diáfise do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a*** ($p < 0,0001$), e diferença significativa entre G1 e G2, b* ($p < 0,05$).	79
Figura 4.17: Gráfico dos valores de Por.N referente a diáfise do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a*** ($p < 0,0001$).	80
Figura 4.18: Gráfico dos valores de Por.Sp referente a diáfise do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a*** ($p < 0,0001$).	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Filtros de Reconstrução.	22
Tabela 4.1: Índices histomorfométricos para a cabeça do fêmur.	68
Tabela 4.2: Parâmetros morfométricos para a diáfise do fêmur.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Antracíclicos (doxorubicina + ciclofosfamida)
ARF	Ativação - reabsorção – formação
ANOVA	“One-way analysis of variance”
BMU	Unidade metabólica Óssea
BV/TV	Razão volume ósseo-volume total
BS/BV	Razão entre a superfície óssea e seu volume
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CIA	Taxa da indução da amenorréia pela quimioterapia
CM	Câncer de mama
CMF	Ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil
DMO	Densidade Mineral Óssea
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GeV	Giga eletrôn-volt
G0	Grupo controle
G1	Grupo tratado com docetaxel e ciclofosfamida
G2	Grupo tratado com doxorubicina e ciclofosfamida
KeV	Kiloeletrôn-volt
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LINAC	Aceleradores Lineares
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONM	Osteonecrose de mandíbula
QT	Quimioterapia
OVX	Ovariectomia
Por. Ct	Razão entre o volume de poros e o volume total da amostra
Por.Th	Espessura média dos poros
Por.Sp	Espaçamento médio dos poros
Por.N	Razão número de poros-volume total (densidade de poros)
°C	Graus Celsius
MeV	Mega eletrôn-volt
RT	Radioterapia

SYRMEP	SYnchrotron Radiation for MEdical Physics
Tb.N	Densidade trabecular
Tb.Sp	Espaçamento trabecular médio
Tb.Th	Espessura trabecular média
TC	Taxanos (docetaxel + ciclofosfamida)
SERMS	Moduladores seletivos dos receptores de estrogênio
SMI	Índice modelo de estrutura
μTC	Microtomografia Computadorizada
μm	Micrômetro

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima para ano 2030, 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (SIEGEL *et al.*, 2013; PARKIN & FERNÁNDEZ, 2006). No Brasil, as estimativas do INCA para o ano de 2014/2015 apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, sendo o câncer de mama (CM) em mulheres, o mais incidente deles, com uma estimativa de aproximadamente 75 mil novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE-INCA, 2014).

As principais modalidades terapêuticas disponíveis, para o tratamento do câncer de mama, são a cirurgia e a radioterapia para o tratamento loco-regional e a hormonioterapia e a quimioterapia para o tratamento sistêmico, e frequentemente aplicam-se duas ou mais destas estratégias concomitantemente para obter um melhor resultado no tratamento do CM (MURAD, 2000; BOUGHEY *et al.*, 2008). A quimioterapia (QT), diferente da cirurgia e da radioterapia, é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, à base de fármacos que na maior parte das vezes impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte.

A grande dificuldade na escolha do melhor esquema de tratamento reside em pesar a magnitude do ganho absoluto versus a toxicidade inerente de cada tratamento. Existem hoje muitos esquemas de QT que podem ser aplicados para o CM, e sempre se aplicam concomitantemente dois ou mais agentes quimioterápicos (poliquimioterapia). Esta associação de fármacos aumenta o efeito antitumoral sem elevar o grau de toxicidade no paciente, proporcionando uma maior eficácia do tratamento, já que estas células neoplásicas sofrem constantes mutações, e podem apresentar uma maior resistência em relação aos fármacos. Esta associação atua, na maior parte das vezes de forma a impedir a divisão celular através da intervenção em uma determinada etapa do ciclo celular (SALATA, 2013). Embora seja um tratamento eficaz para muitos tipos de câncer, a quimioterapia pode ocasionar inúmeros efeitos colaterais, por não distinguir células normais em crescimento ativo (tal como as células do sangue, boca, intestinos e osso) e as células cancerosas (VERA-BADILLO *et al.*, 2013). GUISE, 2006; PFEILSCHIFTER *et al.*, 2000).

Os agentes quimioterápicos mais utilizados na atualidade para o tratamento do câncer de mama são os agentes alquilantes, principalmente a ciclofosfamida; os antimetabólicos, como o 5-fluorouracil e o metotrexato; os antracíclicos, como a epirrubicina e doxorrubicina e, os taxanos, como o paclitaxel e docetaxel, sendo o docetaxel um fármaco introduzido recentemente na prática clínica (ROCHÉ *et al.*, 2006). Os principais regimes de quimioterapia antineoplásica utilizados nos casos de CM são: CMF (ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil), AC (doxorrubicina e ciclofosfamida) e TC (docetaxel e ciclofosfamida). O regime de CMF é utilizado em pacientes com intolerância à doxorrubicina ou pacientes muito debilitados e idosos, com pouca expectativa de sobrevida (SILVA *et al.*, 2011).

Os antracíclicos AC, apesar de sua grande eficácia no controle do câncer e de proporcionar um aumento na expectativa de vida dos pacientes, estão associados a vários efeitos colaterais agudos e crônicos, como a infertilidade e a cardiotoxicidade (ROTI ROTI & SALIH, 2012). Alguns estudos sugerem que os esquemas contendo o regime AC possam ser substituídos por esquemas TC, sendo tão efetivos quanto os regimes tradicionais. Sugere-se utilizar quatro ciclos de docetaxel, um taxano, associado à ciclofosfamida, conhecido como esquema TC. Em um estudo feito pela US Oncology, 1016 pacientes foram selecionados randomicamente para receber doses de doxorrubicina ($60\text{mg}/\text{m}^3$) e ciclofosfamida ($600\text{mg}/\text{m}^3$) (AC), ou docetaxel ($75\text{mg}/\text{m}^3$) com ciclofosfamida ($600\text{mg}/\text{m}^3$) (TC). Sete anos após o fim do tratamento, o tempo livre da doença e a sobrevida em pacientes tratados com TC foram significativamente melhores que em pacientes tratados com AC (MALHOTRA *et al.*, 2004, HENDERSON, 2011, JONES *et al.*, 2009, SALATA, 2013).

Os taxanos foram introduzidos na prática clínica no início de 1990, primeiro para câncer de mama metastático, e depois no tratamento adjuvante. Ainda hoje são considerados fármacos novos, e não existem muitos estudos retrospectivos que mostrem seus efeitos colaterais em longo prazo. Os dois mais conhecidos taxanos utilizados hoje são o paclitaxel e o docetaxel. Seus mecanismos de ação são idênticos, a principal diferença entre os dois é que o docetaxel é, em média, 1,6 vezes mais ativo que o paclitaxel (BINES *et al.*, 2014, HENDERSON *et al.*, 2011). Os efeitos associados com a fertilidade do docetaxel foram descritos em estudos anteriores, mas são discordantes (ZHOU *et al.*, 2010, SALATA, 2013).

Em um estudo realizado por MINISINI *et al* (2009), as pacientes que foram tratadas pelo regime TC, tiveram um aumento de indução da amenorréia pela quimioterapia (CIA), entretanto o índice de pacientes que se recuperaram da amenorréia foi maior do que o índice de pacientes que foram tratadas com o regime AC. Apesar destes resultados, não ficou claro se a utilização do regime TC aumentou a taxa de CIA em comparação com o uso do regime AC (PÉREZ-FIDALGO *et al.*, 2010). Foi levantada a hipótese de que, regimes quimioterápicos, que incluem a ciclofosfamida podem agravar a incidência da CIA, e estudos relataram que quanto maior as doses de ciclofosfamida, mais elevadas são as taxas de CIA (REYNO *et al.*, 1982; BRINCKER *et al.*, 1987). Apesar do docetaxel não estar associado a taxas elevadas de CIA, a ciclofosfamida parece contribuir diretamente para elevar esta taxa (ZHOU *et al.*, 2010).

Uma consequência importante da CIA, ou seja, do comprometimento da fertilidade, em mulheres tratadas para o CM, é a perda da densidade mineral óssea (DMO). Sabe-se que a insuficiência ovariana, induzida pela quimioterapia, em mulheres na pré-menopausa, pode acarretar uma perda óssea rápida (PEYMAN *et al.*, 2009), onde o estrogênio desempenha um papel central na manutenção da massa óssea, pois está diretamente associado à remodelação óssea, acarretando assim a perda óssea (SHAPIRO *et al.*, 2010).

A perda da DMO pode ser induzida pela quimioterapia através de mecanismos indiretos, quando as drogas causam danos no ovário, reduzindo os níveis de estrogênio; ou através de mecanismos diretos, como diversos estudos comprovaram que drogas como doxorrubicina podem afetar adversamente os osteoblastos e / ou osteoclastos diretamente, levando a um quadro clínico da osteoporose (DAVIES *et al.*, 2002, HADJI *et al.*, 2012).

A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica, caracterizada pela diminuição de massa óssea (perda da DMO), deterioração da micro-arquitetura e por mudanças que ocorrem no tecido ósseo, resultando em um aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade ao risco de fratura (FENG, 2011). Os efeitos da osteoporose, ou seja, da perda da DMO são maiores nos ossos longos, como o fêmur, ou nos ossos da coluna. Apesar disso, alguns estudos demonstram que ocorre perda óssea sistêmica devido à deficiência estrogênica (FALONI & CERRI, 2007). Para analisar as mudanças ocorridas na micro-arquitetura óssea devido à diminuição da massa óssea corporal,

utiliza-se comumente o rato, já que este é um animal modelo na investigação pré-clínica da osteoporose.

O estudo através deste mamífero oferece diversas vantagens, em função da capacidade destes animais de espelhar mudanças que acontecem de forma natural no osso humano. Dentre as inúmeras vantagens, é possível destacar algumas como o fato de que o estudo pode ser realizado sob condições padronizadas; que a investigação pode ser realizada com um baixo custo; que os ratos possuem a remodelação do osso trabecular muito semelhante à remodelação observada em ossos trabeculares humano; que é possível realizar facilmente testes biomecânicos em ossos de ratos sob condições padronizadas, e por fim, não menos importante, o fato de que a anatomia do esqueleto do rato possui semelhanças com a do esqueleto humano (MOSEKILDE, 1995).

A imagem da estrutura óssea do rato requer uma alta resolução espacial, visto que esta estrutura é muito menor que a dos ossos humanos. Desta forma, para um estudo detalhado destas microestruturas ósseas, a microtomografia computadorizada (μ TC) oferece uma análise minuciosa da arquitetura óssea, da ordem de micrômetros, de forma qualitativa e quantitativa, em duas e três dimensões. Desta forma, para que seja possível alcançar uma resolução nesta ordem de grandeza, é necessário que a fonte de raios X seja dotada de um tamanho focal significativamente menor que a utilizada pela tomografia computadorizada, limitando assim a intensidade de feixe de raios X. Assim, a combinação da técnica μ TC com a radiação síncrotron é essencial para a obtenção de imagens com uma alta resolução, já que os síncrotrons são capazes de gerar um feixe de raios X extremamente intenso, fornecendo assim uma quantificação mais precisa através do cálculo dos parâmetros morfométricos.

Os síncrotrons além de gerar um feixe de raios X extremamente intenso, fornecem vantagens notáveis, como por exemplo, feixes de raios X altamente colimado e com um alto grau de coerência espacial (MARGARITONDO *et al.*, 1995). Além disso, oferecem também um espectro com uma ampla faixa de energia, e com a utilização de cristais monocromadores é possível obter feixes praticamente monocromáticos com energia selecionável. Estas características são perfeitas para obtenção das imagens microtomográficas e conseqüentemente para o cálculo dos parâmetros morfométricos.

Alterações morfométricas 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, além de danificar a amostra (MÜLLER *et al.*, 1998). Desta forma, muitos estudos com morfologia dos ossos têm sido feitos com o auxílio da microtomografia computadorizada (μ TC), pois permite investigações não destrutivas.

Em 1989, FELDKAMP *et al.* desenvolveram uma técnica para a análise de estruturas trabeculares através da μ TC, em que é possível avaliar quantitativamente as estruturas através da histomorfometria óssea, a qual foi fundamental na estereologia. Os parâmetros quantificados foram 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).

MULLER *et al.* (1998) fizeram um estudo comparativo entre a quantificação histomorfométrica pela μ TC e a histomorfometria convencional. Para isto, foram avaliadas biopsias de osso humano. Os resultados exibiram uma correlação linear altamente significativa ($p < 0,0001$) entre a histologia convencional e a μ TC para BV/TV ($r = 0,93$), BS/TV ($r = 0,91$), Tb.Th ($r = 0,84$) e Tb.Sp ($r = 0,91$). Os autores verificaram também que a μ TC é uma técnica não-destrutiva, rápida e muito precisa que permite a medição do osso esponjoso e compacto em biópsias ou em pequenos ossos, bem como a determinação automática tridimensional dos índices morfométricos.

TROMP *et al.* (2006) calcularam os efeitos ocasionados no osso trabecular da cabeça do fêmur de ratas ovariectomizadas (OVX), ou seja, efeitos de deterioração no osso devido a diminuição da produção de estrogênio. Realizaram uma análise histomorfométrica da microtomografia, através de um microtomógrafo portátil, com uma resolução de 26 μ m, utilizando feixe policromático. A deficiência de estrogênio resultou em uma significativa diminuição do parâmetro histomorfométrico BV/TV para as ratas que sofreram a operação, enquanto que os parâmetros Tb.Sp, DA (grau de

anisotropia) e o SMI (Structure Model index) tiveram um aumento significativo no grupo OVX. A espessura trabecular Tb.Th aumentou, porém não significativamente.

LARRIERA *et al.* (2010) através da μ TC, calculou a porosidade cortical, ou seja, razão entre o volume de poros e o volume total da amostra, calculou também a média do diâmetro dos poros, na metáfise da tíbia de ratas, as quais foram previamente ovariectomizadas. Este trabalho verificou que a porosidade cortical aumentou 32% no osso da tíbia, 6 semanas após a OVX, assim como um aumento no diâmetro do canal vascular nesta mesma região. As alterações microestruturais que ocorrem nos poros (canais) têm um impacto significativo sobre as propriedades mecânicas do osso cortical (YENI & NORMAN, 2000; McCALDEN *et al.*, 1993), pois afetam o gradiente da pressão do fluido sanguíneo (WANG *et al.*, 1999), e o aumento da porosidade cortical no osso do fêmur, assim como o aumento do diâmetro dos poros está associado com maior risco de fratura (BELL *et al.*, 1999).

1.1 Objetivos

O objetivo principal desta tese foi avaliar as alterações nas microestruturas ósseas do fêmur de ratas submetidas a procedimentos de quimioterapia para o câncer de mama, através da microtomografia computadorizada utilizando a luz síncrotron.

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

- ✓ Avaliar a viabilidade do uso da técnica de microtomografia por luz síncrotron para a quantificação de parâmetros morfométricos do osso do fêmur de ratas, cabeça do fêmur e diáfise, tratadas por poliquimioterápicos, utilizados no tratamento de CM;
- ✓ Avaliar, através dos parâmetros morfométricos, calculados para a cabeça do fêmur (parte trabecular) e para a diáfise do fêmur (parte cortical), os efeitos tardios ocasionados pelos diferentes poliquimioterápicos utilizados, comumente, no tratamento de CM;
- ✓ Comparar os resultados entre os grupos tratados e o grupo controle;

- ✓ Comparar os resultados entre os grupos tratados, para averiguar qual dos tratamentos afetam mais negativamente o osso.
- ✓ Avaliar os efeitos no osso causados pelo tratamento do poliquimioterápico TC (docetaxel e ciclofosfamida), já que o docetaxel é um quimioterápico recente no mercado e quase não existem estudos retrospectivos referentes a efeitos adversos do mesmo.

1.2 Motivação

Mulheres com CM tratadas com quimioterapia têm um risco aumentado de desenvolver osteoporose e fraturas. Considerando o surgimento anual de novos casos de câncer de mama e a submissão da maioria das pacientes ao tratamento de quimioterapia, torna-se de grande importância, a compreensão dos efeitos colaterais tardios no tecido ósseo sadio, induzidos por estes tratamentos. A análise das microestruturas ósseas é fundamental para um planejamento mais eficaz do tratamento do câncer, para que seja possível reduzir os riscos de fraturas decorrentes do tratamento, evitando assim que as pacientes alcancem um quadro osteoporótico.

CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 A Tomografia Computadorizada

A tomografia computadorizada (TC) desenvolvida por Godfrey N. Hounsfield em 1972 (HOUNSFIELD, 1973), é uma técnica de ensaio não-destrutivo que revolucionou a radiologia médica, permitindo 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 de raios X foi originalmente desenvolvida para uso médico, sendo o primeiro teste realizado numa amostra de cérebro humano preservado. O primeiro protótipo não utilizava um tubo de raios X, mas sim uma fonte de Amerício 241, e o processo de reconstrução da imagem demorou cerca de nove dias. Eventualmente, perceberam as ilimitadas aplicações da TC no campo das indústrias, geologia, odontologia, biologia, entre outros, já que as amostras podem ser analisadas através desta técnica sem que estas sejam destruídas ou danificadas. O desenvolvimento da TC proporcionou a Hounsfield o prêmio Nobel de medicina em 1979.

A importância da tomografia computadorizada está na capacidade de distinguir quantitativamente pequenas diferenças na atenuação da radiação no corpo examinado, de modo que esta diferença pode ser relacionada às diferenças de densidades físicas no corpo. 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. 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. A microtomografia Computadorizada possui o mesmo embasamento da tomografia, sendo esta desenvolvida especialmente para a inspeção de microestruturas. O diferencial desta técnica está relacionado ao tamanho reduzido do foco assim como os elementos de *pixel* do detector, fornecendo uma maior resolução a imagem obtida. O princípio da formação da imagem microtomográfica é exibido na figura 2.1.

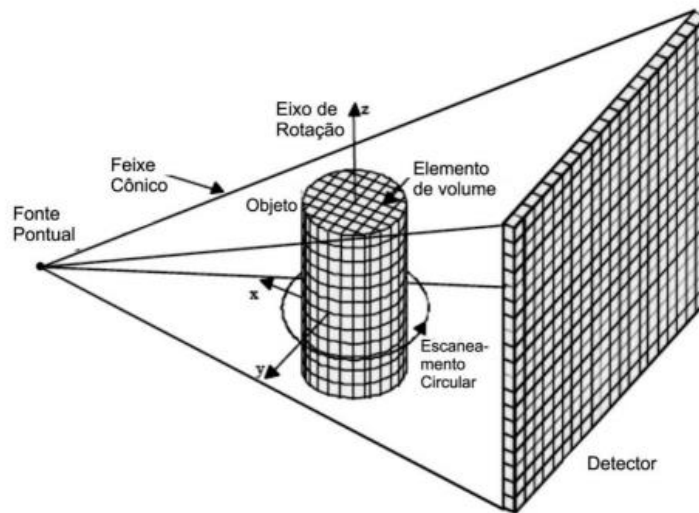


Figura 2.1 Princípio da formação da imagem microtomográfica (ANDREUCCI, 2006).

2.2 A Reconstrução de Imagens Tomográficas

O princípio da reconstrução tomográfica foi apresentado em 1917, por Johann Radon, um matemático austríaco, que demonstrou que um objeto poderia ser reconstruído a partir de múltiplas projeções obtidas segundo ângulos diferentes. A descoberta de Radon só pôde ser implementada no final da década de 60, com a melhoria das capacidades de cálculo dos computadores da época. A aplicação à imagiologia só ocorreu na década de 70, quando Hounsfield e Cormack (HOUNSFIELD, 1973), apresentaram o primeiro tomógrafo e somente através da elaboração e aplicação desta ferramenta matemática, é que foi possível o desenvolvimento desta técnica na medicina.

A palavra tomografia vem do grego “*tomo*” (seção) + “*graphein*” (grafia). Tomografia, portanto, remete a uma imagem da seção transversal de um objeto, a partir de dados coletados deste objeto iluminado em diversas direções. O impacto desta técnica na medicina foi revolucionário, uma vez que permitiu aos médicos visualizar órgãos internos (ensaio não-destrutivo) com precisão e segurança nunca vista para o paciente. Existem numerosas aplicações de imagens por tomografia computadorizada, como por exemplo, nas indústrias e nas diversas áreas de pesquisa científica. Fundamentalmente, a tomografia reconstrói imagens a partir de suas projeções. No sentido estrito da palavra, uma projeção em um determinado ângulo é a integral da imagem no sentido indicado por esse ângulo (KAK, 1987).

Para dar início ao estudo através dos fundamentos matemáticos, será considerado, inicialmente, um feixe com uma intensidade inicial I , produzido por uma fonte de radiação X monocromática, o qual incide sobre uma lâmina de material heterogêneo e de espessura Δx . O feixe emerge da lâmina com intensidade $I - \Delta I$, sendo ΔI a variação que ocorre com o feixe devido à interação da radiação com a lâmina, e para realizar a reconstrução de uma seção transversal, a tomografia de raios X utiliza, como informação externa, a atenuação que um feixe de raios X sofre ao atravessar um objeto.

Matematicamente a expressão, para a variação da intensidade do feixe por unidade de comprimento, representa o coeficiente de atenuação devido ao efeito fotoelétrico, ao espalhamento Compton, a produção de pares e também ao espalhamento Rayleigh. Neste caso, negligenciaremos o efeito de produção de pares devido a altas energias e o espalhamento Rayleigh devido a baixas energias, sendo adotado $\tau(x)$ e $\mathcal{G}(x)$ como os coeficientes de atenuação para o efeito fotoelétrico e para espalhamento Compton no ponto x , respectivamente. Pode-se expressar esta variação de intensidade do feixe por unidade de comprimento (Lei de Beer-Lambert), como:

$$-\frac{\Delta I}{I} \cdot \frac{1}{\Delta x} = \tau(x) + \mathcal{G}(x) \quad (2.1)$$

A soma destes efeitos é dada pelo coeficiente de atenuação $\mu(x)$, que representa a atenuação média dos dois efeitos por comprimento. Este parâmetro varia com o tipo de material absorvedor e com a energia do feixe (EISBERG & RESNICK, 1994). Considerando este parâmetro e aplicando o limite a esta variação infinitesimal, a equação (2.1) torna-se:

$$-\frac{dI}{I} = \mu(x) dx \quad (2.2)$$

Argumentando que a lâmina possua um comprimento x , e que o feixe incidente possua uma intensidade I_0 , e que este deixa a lâmina com uma intensidade I . É possível integrar ambos os lados da expressão, da seguinte forma;

$$\int_{I_0}^I \frac{dI}{I} = -\int_0^x \mu(x) dx \quad (2.3)$$

o que procede em;

$$\ln \frac{I}{I_0} = -\int_0^x \mu(x) dx \quad (2.4)$$

ou

$$I = I_0 \exp\left(-\int_0^x \mu(x) dx\right) \quad (2.5)$$

Esta equação exhibe a relação exponencial entre a atenuação da intensidade do feixe incidente sobre a amostra e os efeitos de interação da radiação com a matéria,

ligados ao tipo de material sobre o qual o feixe incide. Como em um objeto real o coeficiente de atenuação varia de um ponto para outro, a atenuação sofrida por um fóton de raio X ao longo de um caminho A não será necessariamente igual à atenuação sofrida ao longo de um caminho B. Em outras palavras, o número de fótons I que emergem de uma trajetória A não será necessariamente igual ao número de fótons provindo de uma trajetória B. Desta forma, faz-se necessário a introdução do conceito de projeção, apresentado a seguir.

2.2.1 Projeções

Se o objeto for homogêneo, o coeficiente de atenuação pode ser calculado facilmente através do conhecimento da intensidade inicial da fonte e da intensidade medida no detector, pois ele é constante ao longo de todo o corpo. Entretanto, para um objeto de material heterogêneo, o produto μx é substituído por uma integral de linha e a intensidade de saída do feixe torna-se uma função da posição, obtendo assim;

$$I = I_0 \exp\left(- \int_{\text{linha}} \mu(x) ds\right) \quad (2.6)$$

sendo ds o elemento diferencial na direção fonte-detector.

O termo entre parênteses na equação acima, a menos de um sinal, corresponde à soma de todos os coeficientes de atenuação ao longo de todo o trajeto da radiação, desde a fonte até o detector, por isso é denominado como raio soma. Se uma série de linhas paralelas é medida, um perfil de intensidade é obtido, o qual é chamado de projeção (KAK, 1987). Desta forma, o raio soma pode ser determinado matematicamente;

$$\int_{\text{linha}} \mu(x) ds = \left| -\ln \frac{I}{I_0} \right| \quad (2.7)$$

onde o valor do raio soma pode ser determinado experimentalmente, através da intensidade da radiação na fonte e a intensidade medida no detector, após a passagem da radiação pela amostra.

De fato, na prática, almeja-se determinar os coeficientes de atenuação do corpo de prova, em sua natureza bidimensional, de um corpo heterogêneo (Figura 2.2). Assim, para dar continuidade ao estudo o parâmetro μ será em função da coordenada x e também da coordenada y .

$$\int_{\text{raio}} \mu(x, y) ds = \ln \frac{I_0}{I} \quad (2.8)$$

Desta maneira, inicialmente assumiremos uma função bidimensional $f(x, y)$, onde as linhas que a cortam (em qualquer direção) são denominadas de raios e a integral de linha, ao longo destes raios, são os raios-soma.

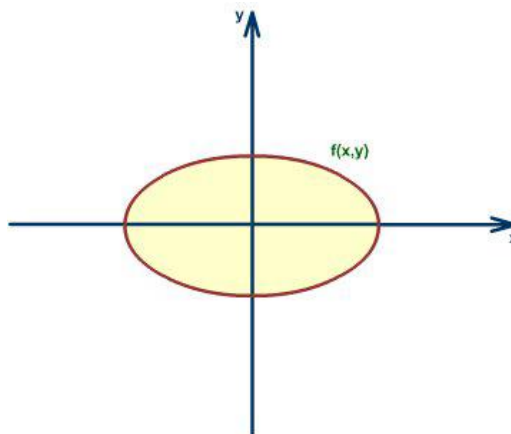


Figura 2.2: Representação dos coeficientes de atenuação em uma seção transversal.

Através de um conjunto de raios-soma, paralelo ou divergente, obtêm-se a formação de uma projeção. A forma mais comum de representar o conjunto de projeções chama-se sinograma, que constitui uma figura bidimensional, na qual

representa-se no eixo horizontal o local de detecção dos fótons (*pixel*) e na vertical a posição angular da amostra com relação ao centro de coordenadas. As projeções coletadas são organizadas ordenadamente em um sinograma, na qual cada linha corresponde à projeção adquirida em um ângulo θ . O sinograma representa a transformada de Radon da imagem original. No caso de raios paralelos, uma projeção pode ser descrita por:

$$P_{\theta}(r) = \int_{AB} f(x, y) ds \quad (2.9)$$

sendo AB a linha ao longo do qual a integral será calculada, r 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 (2.10) e uma representação esquemática é exibida através da figura 2.3.

$$r = x \cos \theta + y \sin \theta \quad (2.10)$$

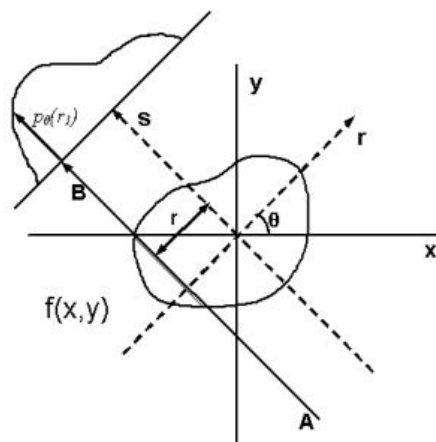


Figura 2.3: Representação esquemática do raio soma (KAK,1987).

A amplitude da curva para um determinado valor r é em função dos coeficientes de atenuação ao longo do caminho AB . A curva $P(r)$ é denominada projeção e constitui a informação necessária para a reconstrução de uma seção transversal (slice). Isto significa que, para um dado ângulo θ , somente as coordenadas x e y , que satisfizerem à expressão (2.10) é que estarão sobre a linha AB e desta forma somente os pontos $f(x, y)$ com tais coordenadas irão contribuir com a integral de linha $P_\theta(r)$, ou seja, não entrará no cálculo da integral para a posição r na projeção, todo o restante da função $f(x, y)$ que estiver fora da linha. Assim, utilizando a função delta de Dirac, é possível reescrever a equação 2.9, como:

$$P_\theta(r) = \int_{AB} f(x, y) ds = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) \delta(x \cos \theta + y \sin \theta - r) dx dy \quad (2.11)$$

O lado direito da equação acima é chamado de Transformada de Radon da distribuição $\mu(x, y)$, representada pela função $f(x, y)$, onde o problema da reconstrução é inverter a Transformada de Radon para encontrar $\mu(x, y)$ a partir de um conjunto de projeções $P_\theta(r)$.

Na tomografia computadorizada, ao detectar a radiação que passa pelo corpo de prova, utiliza-se um algoritmo de reconstrução, para a obtenção dos dados do coeficiente de atenuação da amostra e, no final, é alcançada uma imagem em níveis de cinza, que corresponde aos níveis do coeficiente de atenuação. No caso, os dados obtidos, são as projeções tomadas da amostra, em todas as direções possíveis. A Figura 2.4 mostra um exemplo de projeção paralela, sendo esta definida pelo parâmetro r como uma variável e pelo parâmetro θ , que é constante.

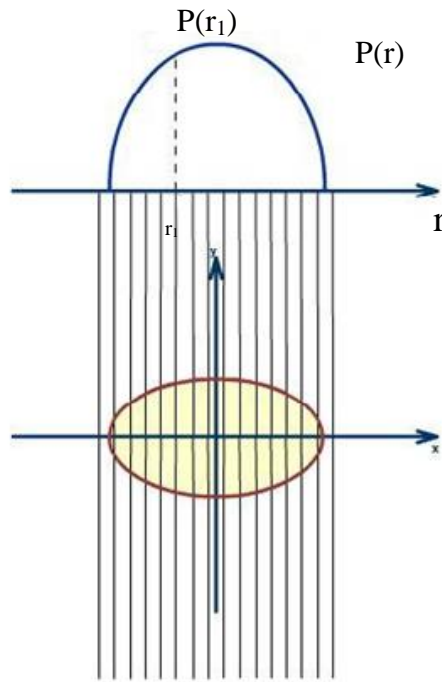


Figura 2.4: *Projeção Paralela.*

A seguir será mostrado o Teorema da Projeção de Fourier, onde estas projeções paralelas serão utilizadas para calcular os coeficientes de atenuação do corpo de prova, onde o resultado é equivalente a uma “transformada inversa” de Radon.

2.2.2 Teorema da Projeção de Fourier

O Teorema da Projeção, também conhecido como o Teorema da Faixa Central, relaciona as projeções unidimensionais (paralelas) de um objeto com sua transformada de Fourier bidimensional. Este teorema é de grande importância e constitui uma ferramenta fundamental para o método de reconstrução por **retroprojeção filtrada**. Para dar início ao teorema, será apresentada a transformada de Fourier da função bidimensional $f(x, y)$ e da função unidimensional $P_\theta(r)$, como segue:

$$F(u, v) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-i2\pi(ux+vy)} dx dy \quad (2.12)$$

$$S_{\theta}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta}(r) e^{-i2\pi\omega r} dr \quad (2.13)$$

Igualando-se a variável v da transformada $F(u,v)$ a zero, notar-se-á que a expressão final se resume na transformada da projeção inicial ($\theta=0$) como segue;

$$\begin{aligned} F(u,0) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) e^{-i2\pi ux} dx dy \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} \left[\int_{-\infty}^{\infty} f(x,y) dy \right] e^{-i2\pi ux} dx \end{aligned} \quad (2.14)$$

$$= \int_{-\infty}^{\infty} P_0(r) e^{-i2\pi ur} dr = S_0(\omega)$$

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

$$\begin{cases} u = \omega \cos \theta \\ v = \omega \sin \theta \end{cases} \quad (2.15)$$

Assim, representar a transformada de $f(x,y)$ por $F(u,v)$ ou por $F(\omega,\theta)$ tem o mesmo efeito, e mais $F(u,0) = F(\omega,0) = S_0(\omega)$. A partir de agora será mostrado que o resultado anterior é válido também para quando o $\theta \neq 0$. Desta forma, as variáveis x e y serão substituídas por duas outras (r,s) , que são coordenadas de um sistema cartesiano girado de um ângulo θ , o qual coincide com o sistema de coordenadas das projeções. Através da figura 2.4, a qual representa uma projeção paralela, é possível observar que a coordenada s coincide com a direção do raio soma e que a coordenada r corresponde

ao eixo perpendicular aos mesmos raios-soma e que é paralela a direção da projeção. Desta maneira, observa-se que a matriz de rotação abaixo realiza a ligação entre (r, s) e (x, y) :

$$\begin{bmatrix} r \\ s \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \theta & \text{sen} \theta \\ -\text{sen} \theta & \cos \theta \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x \\ y \end{bmatrix} \quad (2.16)$$

Ou seja, qualquer ponto (x, y) de f possui coordenadas (r, s) calculadas por meio da matriz de rotação (2.16), representando a equação de raio-soma em função das novas variáveis r e s . Desta maneira, temos que;

$$P_{\theta}(r) = \int_{-\infty}^{\infty} f(r, s) ds \quad (2.17)$$

E a transformada de Fourier da projeção é dada por;

$$S_{\theta}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta}(r) e^{-i2\pi r \omega} dr = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(r, s) ds e^{-i2\pi \omega r} dr \quad (2.18)$$

Regressando ao sistema de coordenadas de x e y , e substituindo r por $x \cos \theta + y \text{sen} \theta$, vem que;

$$\begin{aligned} S_{\theta}(\omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y) e^{-i2\pi \omega (x \cos \theta + y \text{sen} \theta)} dx dy \\ &= F(u, v) \quad \text{para } u = \omega \cos \theta; \quad v = \omega \text{sen} \theta \\ &= F(\omega, \theta) \end{aligned} \quad (2.19)$$

Dominando as informações de cada projeção $P_\theta(r)$, 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, a função $f(x, y)$ original é calculada através de uma simples transformada inversa:

$$f(x, y) = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} F(u, v) e^{-i2\pi(ux+vy)} dudv \quad (2.20)$$

Segundo o Teorema da Projeção de Fourier, a transformada de Fourier de uma projeção que forma um ângulo θ com o eixo x fornece os valores da transformada bidimensional do objeto ao longo de uma linha radial formando o mesmo ângulo com o eixo u . Desta forma, como mostra a Figura 2.5, calculando a transformada de Fourier de inúmeras projeções, que formam vários ângulos com o eixo x , obtém-se os valores da transformada bidimensional do objeto ao longo de várias linhas radiais:

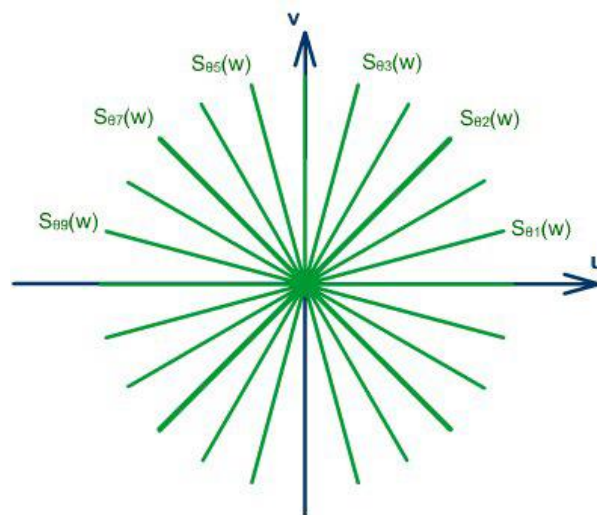


Figura 2.5: Pontos, da transformada bidimensional, obtidos a partir da transformada de várias projeções.

Para isto, a técnica mais conhecida e empregada em reconstrução de imagens é a retroprojeção filtrada. Como será visto a seguir, este método, que tem como fundamento

o Teorema da Projeção, faz uso de uma mudança de coordenadas dos argumentos da transformada bidimensional inversa de Fourier.

2.2.3 Reconstrução Por Retroprojeção 2D

Reconstruindo a função $f(x, y)$, e examinando simultaneamente as projeções de um ângulo θ e $\theta+180^\circ$, é possível observar que estas projeções possuem os mesmos valores, entretanto em ordem inversa, já que os raios-soma de cada projeção são paralelos. Desta maneira, não é necessário utilizar todas as projeções ao longo dos 360° em torno do corpo de prova e sim, somente a metade delas, o que pode ser verificado nas expressões abaixo:

$$\begin{aligned}
 f(x, y) &= \int_0^{2\pi} \int_0^\infty F(\omega, \theta) e^{-i2\pi\omega(x \cos\theta + y \sin\theta)} \omega d\omega d\theta \\
 &= \int_0^\pi \int_0^\infty F(\omega, \theta) e^{-i2\pi\omega(x \cos\theta + y \sin\theta)} \omega d\omega d\theta \\
 &\quad + \int_0^\pi \int_0^\infty F(\omega, \theta + \pi) e^{-i2\pi\omega(x \cos(\theta+\pi) + y \sin(\theta+\pi))} \omega d\omega d\theta \quad (2.21)
 \end{aligned}$$

A transformada de Fourier em coordenadas polares obedece à propriedade apresentada na equação;

$$F(\omega, \theta + \pi) = F(-\omega, \theta) \quad (2.22)$$

A substituição desta propriedade na equação (2.21) resulta na equação;

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega, \theta) e^{-i2\pi\omega(x \cos\theta + y \sin\theta)} |\omega| d\omega d\theta \quad (2.23)$$

Aplicando o Teorema da Projeção $S_{\theta}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{\theta}(r) e^{-i2\pi\omega r} dr = F(\omega, \theta)$, temos

que;

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(\omega) e^{-i2\pi\omega(x \cos\theta + y \sin\theta)} |\omega| d\omega d\theta \quad (2.24)$$

Note que o filtro $|\omega|$ surgiu devido a mudanças de coordenadas (de coordenadas retangulares para polares), sendo matematicamente conhecido como Jacobiano, o qual possui um comportamento que enfatiza as altas frequências presentes nas projeções obtidas no sistema tomográfico. O gráfico do filtro $|\omega|$, conhecido como filtro rampa, está apresentado na Figura 2.6. Este filtro também é conhecido como filtro de *Ramachandran-Lakshminarayanan*, ou simplesmente filtro Ram-Lak, $\omega(\xi)$ é 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. Nesta função 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 2.1) (OLIVEIRA, 2002).

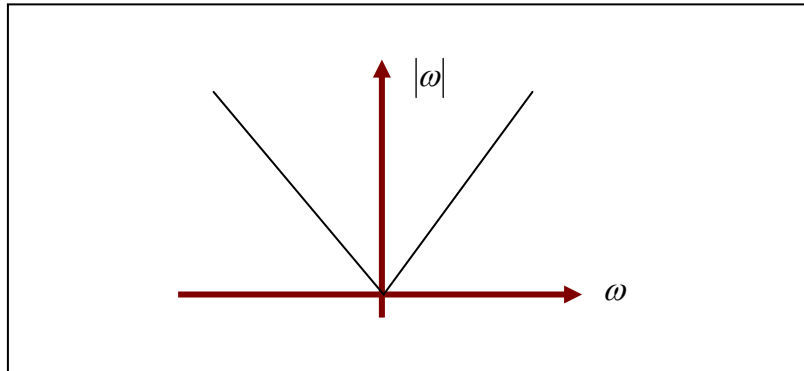


Figura 2.6: Filtro Rampa.

Tabela 2.1: Filtros de Reconstrução.

Filtro	Resposta em Frequência
Ram-Lak	$ \xi \text{rect}(\xi d)$
Shepp-Logan	$ \xi \sin(\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)$

É possível observar que existe um termo nos filtros de suavização apresentados que é justamente o filtro *Ram-Lak*, definido pela equação 2.23, e da composição deles tem-se uma redução ou ênfase dos defeitos e detalhes do objeto a ser reconstruído.

$$\omega(\xi) = |\xi| \text{rect}(\xi d) \quad (2.23)$$

Os gráficos de resposta em frequência e resposta impulsiva dos filtros descritos acima são mostrados na Figura 2.7.

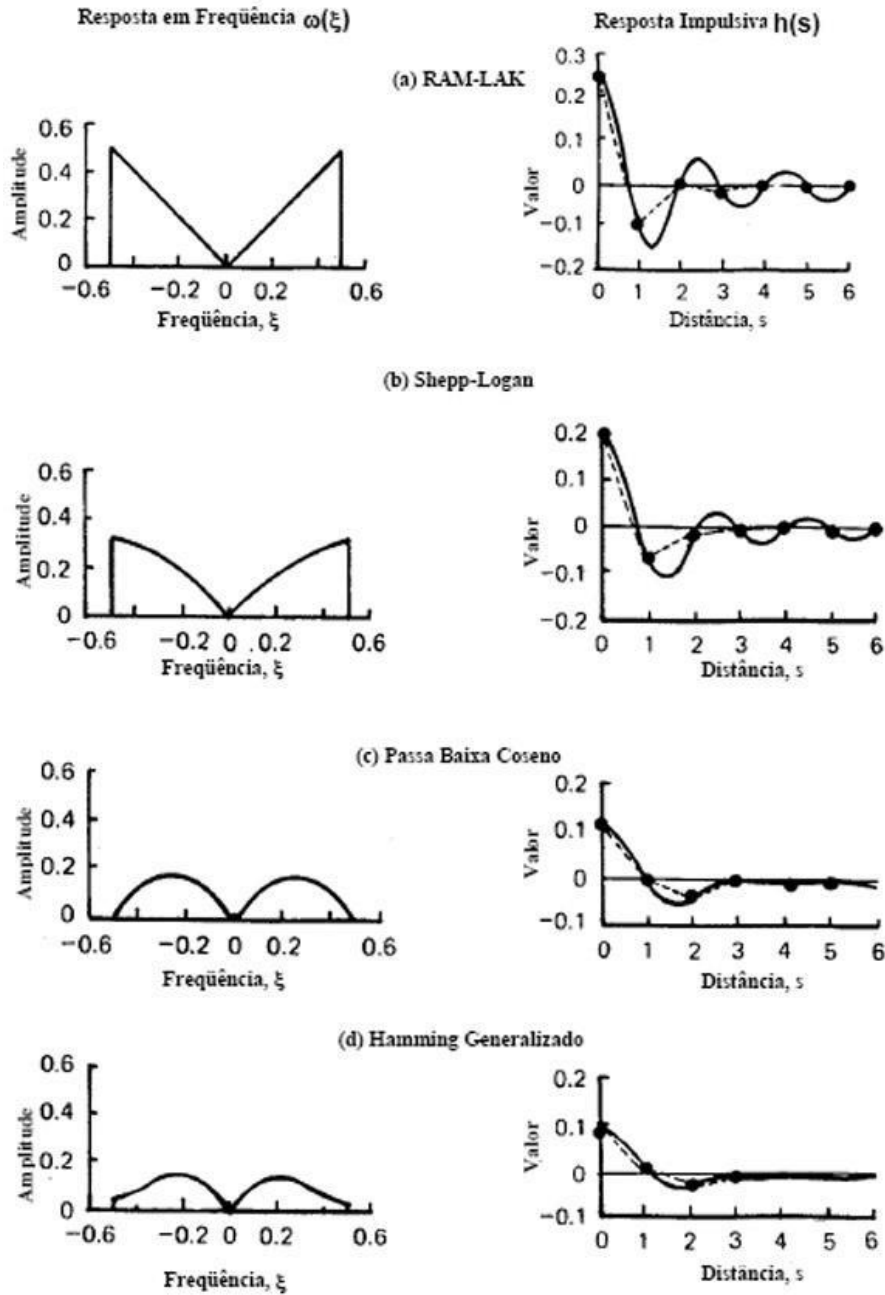


Figura 2.7: Filtros utilizados na reconstrução (OLIVEIRA, 2002).

O filtro rampa possui pesos proporcionais às frequências que compõe a imagem. A multiplicação das projeções com o filtro rampa gera imagens com melhor resolução, pois amplifica os valores das frequências mais altas. Cada projeção é filtrada e no processo, poderá receber valores negativos. O borramento é reduzido na retroprojeção, pois esses valores cancelar-se-ão com valores positivos nas vizinhanças das bordas das imagens.

A equação 2.24 é a principal do método da retroprojeção filtrada. Este nome surge da interpretação desta equação ao ser dividida em duas integrais:

$$Q_{\theta}(r) = \int_{-\infty}^{\infty} S_{\theta}(\omega) |\omega| e^{i2\pi\omega r} d\omega, \quad r = x \cos \theta + y \sin \theta \quad (2.25)$$

$$f(x, y) = \int_0^{\pi} Q_{\theta}(x \cos \theta + y \sin \theta) d\theta \quad (2.26)$$

A Equação 2.25 é a transformada inversa de Fourier do produto $S_{\theta}(\omega)|\omega|$. Esta multiplicação representa a filtragem da projeção $P_{\theta}(r)$, cuja transformada é $S_{\theta}(\omega)$ pela função $|\omega|$, sendo $Q_{\theta}(r)$ denominada projeção filtrada. A equação 2.26 representa a operação de retroprojeção das projeções filtradas $Q_{\theta}(r)$, em que o valor de um determinado ponto de coordenadas (x, y) da imagem, é fornecido pelo somatório ou integral, dos diversos valores $Q_{\theta}(x \cos \theta + y \sin \theta)$.

Simplesmente retroprojetar os valores das contagens das projeções não reconstituirá a função original $f(x, y)$ e sim uma $f(x, y)$ borrada. A primeira solução para eliminar o borramento é submeter o conjunto de projeções ao processo de filtragem. Neste processo, a imagem decomposta em um grande número de componentes de frequências será multiplicada por um filtro, que definirá o peso concedido a cada uma dessas componentes. Um filtro é uma operação matemática efetuada em uma imagem capaz de atenuar ou enfatizar diferentes frequências, destacando diferentes características na imagem. Podem ser aplicados tanto no domínio espacial, através da convolução da função matemática que descreve o filtro com a da imagem, ou no domínio de Fourier, através da multiplicação das transformadas de Fourier do filtro e da imagem e realizando a transformada inversa de Fourier do resultado. Computacionalmente, a filtragem no domínio da frequência é muito mais rápida do que a convolução no domínio espacial.

2.3 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo rígido, formado por células (osteócitos, osteoblastos, osteoclastos) e pela matriz óssea. Os osteócitos são encontrados em cavidades da matriz óssea, e dentro dessas lacunas formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, o que torna possível a difusão de nutrientes e conseqüentemente a comunicação entre os osteócitos. A presença deste tipo de célula é fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea. Já os osteoblastos são responsáveis pela produção de colágeno, enzimas e outras substâncias protéicas, que constituem a porção orgânica da matriz óssea. Possuem um sistema de comunicação intercelular semelhante aos osteócitos e estes, inclusive, originam-se dos osteoblastos, quando são envolvidos completamente por matriz óssea. Localizam-se na superfície óssea. Os osteoclastos são células multinucleadas, extensamente ramificadas, derivados de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. Participam dos processos de absorção e remodelação óssea e secretam vários ácidos e enzimas, que atacam a matriz e liberam o cálcio.

As principais funções do tecido ósseo são sustentar o corpo, permitir a realização de movimentos, proteger certos órgãos e realizar a produção de elementos celulares do sangue. A distribuição e organização do osso são distinguidas em dois tipos de tecido ósseo: cortical e trabecular. Esta divisão é evidenciada na figura 2.8.

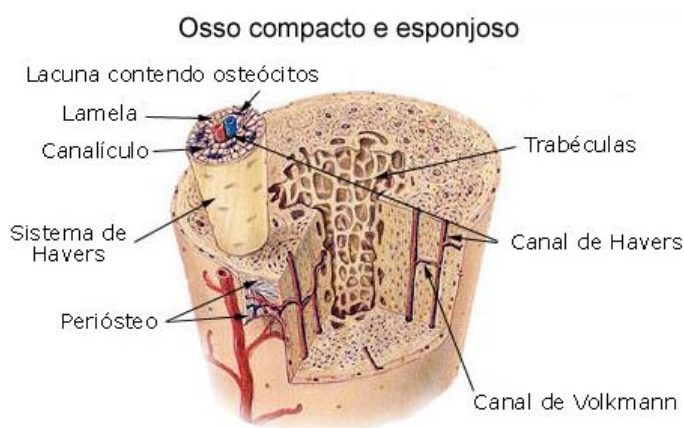


Figura 2.8: Composição do osso (Adaptado de Netter, 2004).

1. Osso Cortical (ou compacto ou lamelar ou denso): O osso cortical representa 70-80% da massa óssea total, sendo encontrado na superfície exterior de todos os ossos. A

sua principal função é a de conferir rigidez ao osso, dependendo da sua proporção relativa, da função e solicitação mecânica do respectivo osso. Caracteriza-se por um valor de fração volumétrica (razão volume de massa óssea/volume total) próximo da unidade, o que justifica a denominação, também utilizada, de osso compacto. O tecido ósseo compacto praticamente não apresenta espaços medulares.

2. Osso Esponjoso (ou trabecular): O osso trabecular corresponde aos restantes 20-30% da massa óssea, estando localizado na porção interior do osso. Ele consiste numa estrutura reticular porosa, com densidade variável e relativamente baixa, que confere flexibilidade e resiliência à estrutura óssea global. Estas propriedades advêm da sua capacidade de absorção de energia proveniente de impactos. Caracteriza-se, ainda, por apresentar um valor relativamente baixo de fração volumétrica, compensando com uma área de superfície, aproximadamente, duas vezes superior à do osso compacto. Este tecido apresenta espaços medulares mais amplos, sendo formado por várias trabéculas que oferecem um aspecto poroso ao tecido.

Como dito anteriormente, o tecido ósseo esponjoso (osso trabecular) apresenta espaços medulares mais amplos, formado por várias trabéculas, que oferecem o aspecto poroso ao tecido. O tecido ósseo compacto (osso cortical) praticamente não apresenta espaços medulares, existindo, no entanto, além dos canalículos, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos, denominados por canais de Volkmann e canais de Havers. Por ser uma estrutura inervada e irrigada, os ossos apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração. Os canais de Volkmann partem da superfície do osso (interna ou externa), possuindo uma trajetória perpendicular em relação ao eixo maior do osso. Estes canais se comunicam com os canais de Havers, os quais percorrem o osso longitudinalmente podendo comunicar-se por projeções laterais. É possível observar várias lamelas concêntricas de substância intercelular e de células ósseas, em torno de cada canal de Havers. Cada conjunto deste, formado pelo canal central de Havers e por lamelas concêntricas é denominado sistema de Havers ou sistema haversiano. Os canais de Volkmann não apresentam lamelas concêntricas (AVIOLI *et al.*, 1990).

2.3.1 Processo de Remodelação Óssea

A remodelação óssea ou remanejamento ósseo é um processo ativo que ocorre em todo o esqueleto, ao longo da vida, para a manutenção da homeostasia mineral. A estrutura óssea é continuamente destruída e reconstruída, garantindo que a mesma seja sempre renovada. O processo de remodelação 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- Bone Mineral Density), (BARON, 1996).

Um desequilíbrio da remodelação óssea, que pode ser reversível ou não, ocasiona mudanças na massa óssea. Este desequilíbrio pode ocorrer, por exemplo, devido a alterações metabólicas oriundas do recebimento de dose de determinados quimioterápicos. 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.

2.4 Segmentação e Quantificação dos Dados Tomográficos

A análise de imagens digitais utiliza diversas ferramentas e a segmentação é aplicada quando se faz necessário definir objetos de interesse na imagem. Este processo de segmentação subdivide uma imagem em suas partes ou objetos constituintes. O nível até o qual esta subdivisão deve ser efetuada, bem como a técnica utilizada, depende do problema que está sendo colocado em questão (PRATT, 2001).

A diferenciação de dois ou mais objetos é realizada através dos algoritmos de segmentação, que permitem distinguir partículas entre si e da imagem de fundo. Esta distinção permitirá ao programa interpretar *pixels* contíguos e agrupá-los em regiões. Os algoritmos de segmentação para imagens monocromáticas são geralmente baseados em uma das seguintes propriedades básicas de valores de níveis de cinza: descontinuidade e similaridade. Na descontinuidade, as principais áreas de interesse são a detecção de pontos isolados, detecção de linha e bordas na imagem. Desta forma, o particionamento da imagem está baseado nas mudanças bruscas dos níveis de cinza. Já na similaridade, os métodos principais se baseiam na limiarização (*thresholding*) e no crescimento de regiões.

A limiarização analisa a similaridade dos níveis de cinza da imagem extraíndo os objetos de interesse através da seleção de um limiar T que separa os agrupamentos de níveis de cinza. Esta segmentação é efetuada varrendo a imagem *pixel a pixel*, e rotulando cada *pixel* como sendo pertencente ao objeto ou ao fundo, dependendo do nível de cinza do *pixel* analisado ser maior ou menor que T . Uma imagem limiarizada (binarizada) $g(x, y)$ é definida como:

$$g(x, y) = 1 \text{ se } f(x, y) \geq T \quad \text{ou} \quad g(x, y) = 0 \text{ se } f(x, y) < T \quad (2.25)$$

em que $f(x, y)$ corresponde ao nível de cinza do ponto e T é um valor de tom de cinza predefinido denominado limiar. Os *pixels* rotulados com o valor 1 correspondem aos objetos de interesse e os rotulados com 0 correspondem ao fundo de imagem, isto é, tudo que não é o objeto de interesse. Este processo pode ser aplicado às imagens tomográficas no processamento dos *voxels*. A seleção do limiar de tom de cinza T pode ser obtida através de um histograma que é um gráfico de distribuição do número de *pixels* na imagem para cada nível de cinza. No histograma (Figura 2.9) é possível observar a distribuição dos valores dos *pixels* na imagem e um valor de limiar que venha distinguir a distribuição correspondente à fase de interesse em relação ao fundo (background) restante (GONZALES & WOODS, 1992, PRATT, 2001, JAHNE, 2001).

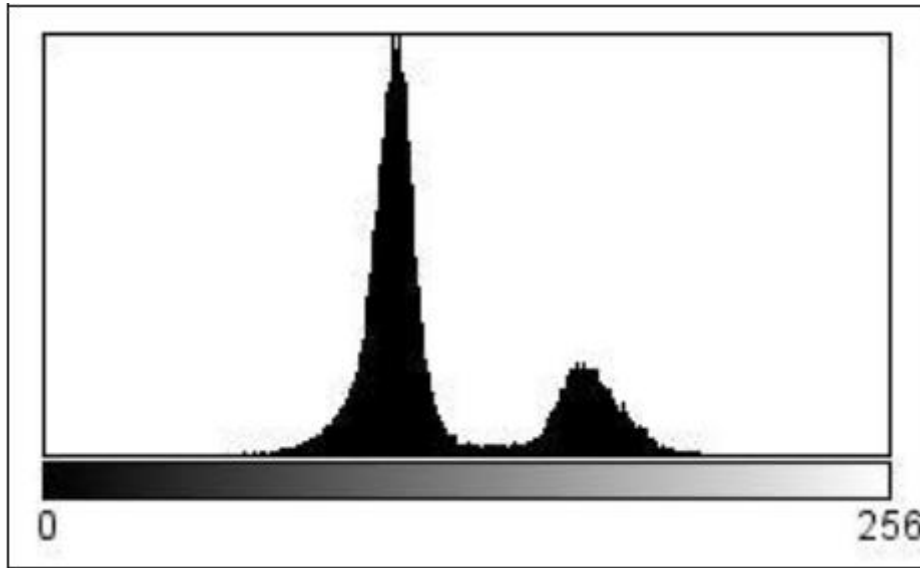


Figura 2.9: Histograma de uma imagem tomográfica 2D de 8-bit (NOGUEIRA, 2011).

Para quantificar a morfologia óssea por μ TC, utilizando os parâmetros morfométricos, é necessário inicialmente selecionar uma região de interesse (VOI) e binarizá-la. O processo de segmentação, como dito anteriormente, consiste na escolha de um valor limiar, que será aplicado à imagem, em que todos os *pixels* cujo valor for maior ou igual ao do limiar são convertidos em um valor denominado de saturado. Em uma imagem digital, com resolução de 8 *bits*, por exemplo, este valor saturado vale 255 (branco). De forma análoga, todos os *pixels* que possuem valor inferior ao do limiar, são convertidos em zero (preto). O procedimento cria uma imagem binária, que realiza a segmentação do tecido ósseo, em que a fase branca corresponde ao tecido ósseo e a fase preta é o restante do tecido não quantificado, como mostra a figura 2.10.

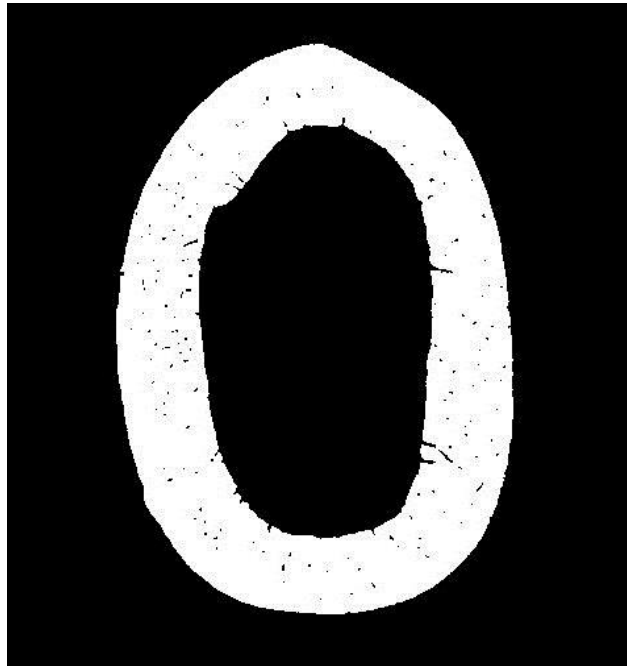


Figura 2.10: Imagem binária da diáfise do fêmur do rato.

A escolha de um valor de limiar é crítico neste método (DING *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.*, 1998; ITO *et al.*, 1998), pois sua escolha possui uma grande influência sobre os índices histomorfométricos. Desta forma, na escolha do limiar, o histograma da imagem é utilizado, para possibilitar a observação da distribuição dos valores dos *pixels* da imagem e para buscar um valor que separe "razoavelmente bem" a distribuição correspondente da fase de interesse do restante (Figura 2.10). 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). Se o feixe for policromático, pequenas variações nos níveis do "threshold" podem gerar grandes variações nos índices histomorfométricos. Uma variação em torno de 0.5% no valor do limiar resulta numa diferença de 5% no parâmetro BV/TV. Para a espessura trabecular Tb.Th esta variação resulta numa diferença menor que 3%, enquanto que para o número trabecular Tb.N o efeito é negligenciável (HARA *et al.*, 2002). NOGUEIRA *et al.*, (2012) mostraram que pequenas variações dos níveis do limiar, podem afetar os índices histomorfométricos, utilizando um feixe monoenergético, no osso trabecular. Para isso, selecionaram um valor do limiar (valor otimizado) e a partir deste selecionaram dois valores de limiar acima do limiar otimizado, assim como dois valores de limiar abaixo

deste, correspondendo a 0,39% por ponto. Os resultados mostraram que os índices histomorfométricos apresentaram pequenas variações para todos os índices, onde a maior variação ocorreu para a espessura trabecular (Tb.Th) (de -2.84% para 2.99%), enquanto que a menor variação ocorreu para o número trabecular (Tb.N) (de -0.26% para 0.35).

Resumidamente, após a seleção de uma região de interesse (VOI), é realizada a escolha do limiar. Em seguida, a imagem é binarizada e posteriormente é realizada a quantificação através do cálculo dos parâmetros morfométricos.

2.4.1 Cálculo dos Parâmetros referentes à região Trabecular

Neste programa (*software BoneJ*), o parâmetro BV/TV, que representa a razão do volume ósseo sobre volume total da amostra, é calculado pelo número de *voxels* correspondentes ao osso (*foreground*), dividido pelo número total de *voxels* da imagem. O parâmetro espessura trabecular Tb.Th foi computado baseado no cálculo do volume da espessura local “*local thickness volume*” (HILDEBRAND & RUEGSEGGGER, 1997a). A espessura local $\tau(n)$ é definida, em qualquer ponto $n \in \Omega \subset \mathbb{R}^3$, como o diâmetro da maior esfera contida no ponto n e que esta completamente contida no interior da estrutura Ω , ie;

$$\tau(n) = 2 \max\{r/n \in esf(x, r) \subseteq \Omega, x \in \Omega\} \quad (2.27)$$

Esta definição foi dada no contexto do espaço contínuo utilizando a distância Euclidiana. A separação trabecular Tb.Sp foi calculada através do mesmo processo que Tb.Th, entretanto é aplicada ao complemento da estrutura de osso trabecular na imagem binarizada. O número trabecular Tb.N é determinado por;

$$Tb.N = \frac{BS}{2TV} \quad (2.28)$$

sendo BS, a superfície do osso trabecular. A superfície óssea é computada através de um algoritmo *marching cubes*, em que a área da superfície óssea é a soma das áreas dos triângulos que compõem a malha (LORENSEN & CLINE, 1987).

O *Marching Cubes* é um algoritmo que cria um modelo triangular sobre as superfícies de densidade constante a partir de dados microtomográficos, para o cálculo do parâmetro BS. Para a construção do problema da superfície existem duas etapas primárias. Inicialmente é necessário localizar a superfície correspondente a um valor especificado pelo usuário e criar os triângulos. Então, para garantir uma imagem de qualidade da superfície é calculado as normais à superfície em cada vértice, de cada triângulo. Este algoritmo utiliza uma aproximação “*divide-and-conquer*” para localizar a superfície de um cubo lógico criado a partir de oito pixels, sendo quatro pixels provenientes de dois slices adjacentes, como exibe a Figura 2.11.

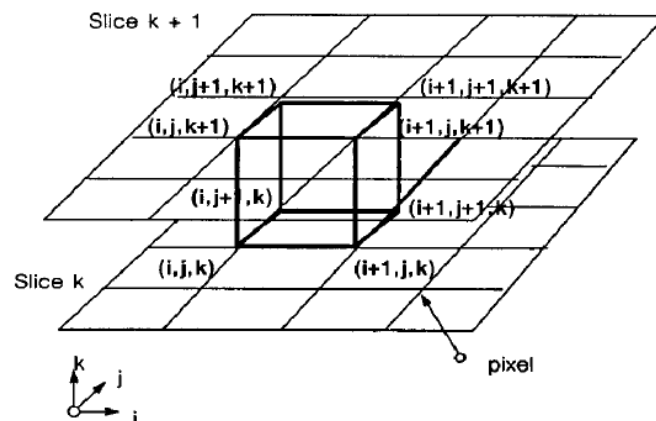


Figura 2.11: *Marching Cube* (LORENSEN & CLINE, 1987).

O algoritmo determina como a superfície intersecta este cubo, e então se move (ou marcha) para o próximo cubo. Para encontrar a intersecção da superfície em um cubo, o algoritmo atribui o índice 1 a um vértice do cubo, se este pixel possuir um valor maior ou igual ao valor da superfície que esta sendo construída, sendo estes vértices localizados dentro (ou sobre) a superfície. Os vértices do cubo que possuem valores abaixo do valor da superfície, o algoritmo atribui o índice zero e estes são considerados fora da superfície. Com este pressuposto, determina-se a topologia da superfície dentro de um cubo e o local da intersecção é encontrado posteriormente.

Em um cubo existem 8 vértices, assim como dois estados (dentro e fora), desta forma existem $2^8=256$ maneiras da superfície interceptar o cubo. A realização da triangulação de 256 casos é possível, porém é um processo tedioso e propenso a erros. Assim, utilizando duas simetrias diferentes do cubo reduz-se o problema de 256 casos até 14 padrões. A topologia da superfície triangular mantém-se inalterada, se a relação dos valores de superfície para os cubos é invertida, já os casos complementares são equivalentes. Desta forma, somente os casos que possuem zero para quatro vértices com valores maiores que o valor de superfície, podem ser considerados, reduzindo assim o número de casos para 128. E utilizando a simetria rotacional, é possível reduzir o problema para 14 padrões. A Figura 2.12 exhibe a triangulação de 14 padrões.

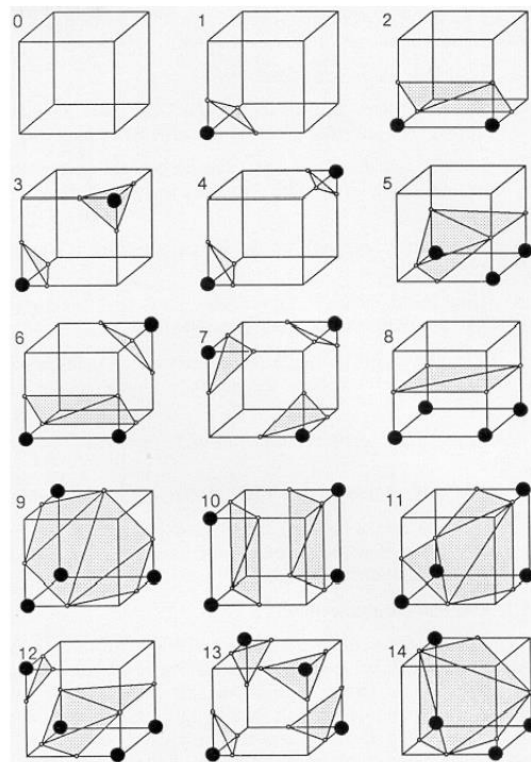


Figura 2.12: Triangulação de 14 padrões (LORENSEN & CLINE, 1987).

O padrão mais simples (0) ocorre se todos os valores de vértices estão acima (ou abaixo) do valor selecionado, desta forma não produz nenhum triângulo. O padrão seguinte (1) ocorre se a superfície se separa sobre o vértice a partir dos outros sete, resultando em um triângulo definido pelos três cruzamentos de arestas. Outros padrões produzem múltiplos triângulos. E com a permutação destes 14 padrões básicos,

utilizando a simetria de rotação, é possível complementar e produzir as 256 maneiras das superfícies interceptarem o cubo.

Desta forma, é criado um índice para cada caso, baseado sobre o estado do vértice e a numeração, como mostra a Figura 2.13, em que existe um bit para cada vértice. Este índice é utilizado como um indicador para uma tabela que define a topologia triangular de 256 casos diferentes, que fornece todas as intersecções da aresta para uma determinada configuração do cubo. Empregando o índice para dizer qual aresta da superfície é interceptada, é possível interpolar a intersecção da superfície ao longo da aresta. Comumente, opta-se por realizar uma interpolação linear, mas interpolações de graus mais elevados também podem ser utilizadas.

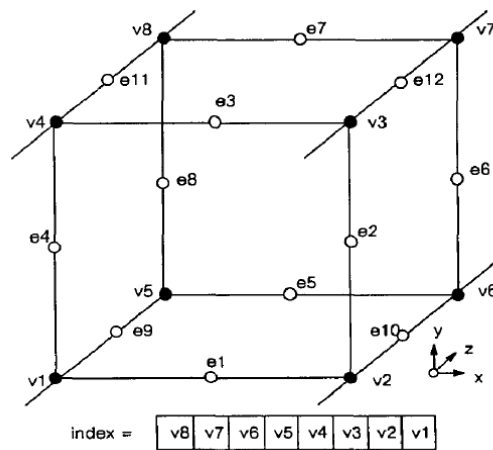


Figura 2.13: Numeração do cubo (LORENSEN & CLINE, 1987).

O último passo deste algoritmo é calcular o vetor normal para cada vértice do triângulo. Uma superfície de densidade constante possui a componente nula do gradiente ao longo da direção tangencial da superfície; e conseqüentemente, a direção do vetor gradiente, \vec{g} , é normal à superfície. Este fato pode ser utilizado para determinar o vetor normal à superfície, \vec{n} , se a magnitude do gradiente não for zero. Já se a superfície de interesse entre dois tipos de tecidos de diferentes densidades possui o vetor gradiente diferente de zero, o vetor gradiente, \vec{g} , é a derivada da função densidade;

$$\vec{g}(x, y, z) = \nabla f(x, y, z) \quad (2.29)$$

Para realizar o cálculo do vetor gradiente na superfície de interesse, inicialmente calcula-se os vetores gradiente nos vértices do cubo e em seguida é realizada a interpolação linear do gradiente no ponto de intersecção. O gradiente, no vértice do cubo (i, j, k) , é calculado ao longo dos três eixos de coordenadas;

$$G_x(i, j, k) = \frac{D(i+1, j, k) - D(i-1, j, k)}{\Delta x} \quad (2.30)$$

$$G_y(i, j, k) = \frac{D(i, j+1, k) - D(i, j-1, k)}{\Delta y} \quad (2.31)$$

$$G_z(i, j, k) = \frac{D(i, j, k+1) - D(i, j, k-1)}{\Delta z} \quad (2.32)$$

em que $D(i, j, k)$ é a densidade no pixel (i, j) no slice k e $\Delta x, \Delta y, \Delta z$ são os comprimentos das arestas do cubo. Dividindo o gradiente pelo seu comprimento, produz-se o vetor normal no vértice, o qual é necessário para a renderização. Posteriormente é realizada a interpolação linear deste vetor normal calculado no ponto de intersecção. Para o cálculo do gradiente em todos os vértices do cubo, é necessário manter quatro slices na memória do computador por vez. Desta forma, realizando todo este processo descrito, o algoritmo *marching cubes* cria uma superfície a partir de um conjunto tridimensional de dados.

O parâmetro SMI, que representa o índice modelo de estrutura “*Structure Model index*” caracteriza a estrutura óssea em forma de chapa “*plate*” ou de haste “*rod*”. Este parâmetro é calculado através de uma análise diferencial da superfície triangular da estrutura e é definido como;

$$SMI = 6 \cdot \frac{BV \frac{dBS}{dr}}{BS^2} \quad (2.33)$$

em que dBS/dr representa a derivada da área de superfície com respeito a medida linear de r relativo a meia espessura. Para uma estrutura em forma ideal de chapa “plate”, o parâmetro SMI possui o valor igual a 0, já para uma estrutura em forma ideal de haste “rod” o valor designado para este índice é de 3, como mostra a Figura 2.14 (HILDEBRAND & RUEGSEGGER, 1997b).

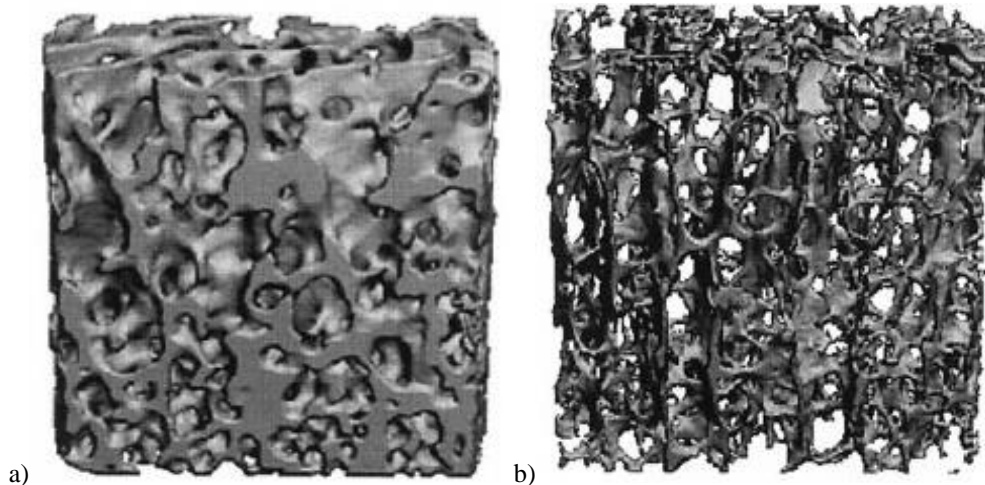


Figura 2.14: a) Estrutura em forma de placa b) Estrutura em forma de haste (DING et al., 2000).

2.4.2 Cálculo dos Parâmetros referentes à região Cortical

O Parâmetro Por.Ct, que representa a porosidade no osso cortical, reflete a razão do volume de poros (Por.V) sobre volume total da amostra. O valor da porosidade é justamente o complemento do valor de BV/TV para o osso cortical, e é análogo ao valor de Ma.V/TV, que é a razão entre volume da medula sobre o volume total da amostra, referente à parte trabecular (COOPER et al., 2003). Desta forma, este parâmetro Por.Ct é calculado pelo número de *voxels* correspondentes ao não-osso (*background*), dividido pelo número total de *voxels* da imagem.

O cálculo dos parâmetros Por.Th (espessura média dos poros) e Por.Sp (separação média dos poros) é baseado no cálculo do volume da espessura local “local thickness volume” (HILDEBRAND & RUEGSEGGER, 1997a), assim como é feito para os parâmetros trabeculares Tb.Th e Tb.Sp. A espessura local dos poros $\tau(n)$ é computada, em qualquer ponto $n \in \Omega \mathbb{R}^3$, como o diâmetro da maior esfera contida no ponto n e que esta completamente contida no interior da estrutura Ω , e o parâmetro

Por.Sp é calculado da mesma maneira, entretanto é aplicada ao complemento da estrutura de osso cortical (imagem binarizada), equação 2.27. Um aspecto interessante destes parâmetros corticais é que eles podem ser calculados com o mesmo software desenvolvido para os cálculos dos parâmetros referente à parte trabecular do osso (COOPER *et al.*, 2003). O parâmetro Por.N, representa o número de poros dividido pelo volume total da amostra, ou seja, pelo número total de *voxels* da imagem, sendo este determinado por;

$$Por.N = \frac{\text{número de poros}}{TV} \quad (2.34)$$

2.5 Tratamento Estatístico

A inferência estatística tem como objetivo a construção e desenvolvimento de métodos que permitem estimar parâmetros de uma população a partir de evidências fornecidas por uma amostra e testar hipóteses com respeito aos parâmetros estimados, ou a natureza da distribuição da população. Os testes de hipóteses são classificados em: paramétricos (a distribuição dos dados é conhecida) e não paramétricos (a distribuição dos dados é desconhecida) (MONTGOMERY & RUNGER, 2012).

2.5.1 Testes de Hipóteses

Muitos problemas em pesquisas quantitativas requerem a decisão entre aceitar ou rejeitar uma afirmação sobre algum parâmetro, sendo necessária a formulação de hipóteses acerca de uma dada amostra, que serão submetidas a testes específicos. Uma hipótese estatística é uma afirmação sobre os parâmetros de uma ou mais populações (MONTGOMERY & RUNGER, 2012).

Existem duas suposições contraditórias que são consideradas em testes de hipóteses com o objetivo de decidir quais das hipóteses estão corretas, a partir das informações da amostra. Inicialmente, uma das hipóteses é favorecida de modo que esta não será rejeitada em favor da hipótese alternativa, a menos que a evidência da amostra

contradiga e forneça forte apoio a afirmação alternativa (MONTGOMERY & RUNGER, 2012).

2.5.2 Hipótese nula e Hipótese alternativa

A hipótese nula H_0 é a alegação inicial que é assumida como verdadeira para a construção do teste. A hipótese alternativa H_1 é a afirmação que é considerada caso a hipótese nula H_0 não tenha evidência estatística que a defenda. Portanto, a hipótese nula será rejeitada em favor da hipótese alternativa somente se a evidência da amostra sugerir que H_0 seja falsa. Caso a amostra não contradiga fortemente H_0 , continua-se a acreditar na verdade da hipótese nula. Assim, num testes de hipóteses, apenas duas decisões podem ser tomadas: rejeitar H_0 ou não rejeitar H_0 (MEYER, 1983).

2.5.3 Erros do tipo I e II

O erro tipo I ocorre quando uma hipótese é rejeitada quando deveria ser aceita. Por outro lado, o erro tipo II ocorre quando uma hipótese que deveria ser rejeitada é aceita (MONTGOMERY & RUNGER, 2012).

2.5.4 Nível de significância e p-valor

O nível de significância de um teste de hipóteses é a probabilidade máxima de aceitar o erro tipo I e pode ser estipulada de acordo com o pesquisador. Em geral, o nível de significância é representado por α , sendo escolhidos os níveis $\alpha = 0,01$ ou $0,05$, isto é, se escolhido o índice de $0,01$, então existe 1 chance em 100, da hipótese ser rejeitada. Ou seja, podemos dizer que existe uma confiança de 99% de que se tome a decisão correta. O valor da probabilidade de se obter o efeito observado, dado que a hipótese nula é verdadeira, é chamado de p-valor. Se o valor do p-valor for menor que o nível de significância estipulado, assume-se o erro tipo I e rejeita-se a hipótese nula. Ao contrário, se o p-valor for maior, não é assumido o erro tipo I e se aceita a hipótese nula (MAGALHÃES & DE LIMA, 2001).

2.5.5 Testes de Normalidade

Os testes paramétricos necessitam de alguns pressupostos, a distribuição de frequências dos erros amostrais é normal, as variâncias são homogêneas e os efeitos dos fatores de variação são aditivos e os erros independentes. Os testes de normalidade são utilizados para verificar se a distribuição de probabilidade associada a um conjunto de dados pode ser aproximada pela distribuição normal. Para isso, se utilizam alguns testes de normalidade, dentre eles destaca-se o Kolmogorov-Smirnov.

2.5.5.1 Kolmogorov-Smirnov

O teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para uma amostra é um teste de aderência e verifica o grau de concordância entre a distribuição de um conjunto de valores e alguma distribuição teórica. O teste de Kolmogorov-Smirnov pode ser utilizado para avaliar as hipóteses:

H_0 : Os dados seguem uma distribuição normal.

H_1 : Os dados não seguem uma distribuição normal.

Seja $F_0(X)$ uma função especificada de distribuição teórica sob H_0 . Então, para qualquer valor de X , o valor de $F_0(X)$ corresponde à proporção de casos esperados com escores menores ou iguais a X . Por outro lado, seja S_N a distribuição observada de frequências relativas acumuladas de uma amostra aleatória de N observações. Para X_i igual a um escore qualquer possível, $S_N(X_i) = F_i/N$, onde F_i corresponde ao número de observações menores ou iguais a X_i . Assim, $F_0(X_i)$ é a proporção esperada de observações menores ou iguais a X_i .

Quando H_0 é verdadeira, espera-se que as diferenças entre $S_N(X_i)$ e $F_0(X_i)$ sejam pequenas e que estejam dentro do limite dos erros aleatórios. Portanto, a estatística utilizada para o teste é $D = \max | F_0(X_i) - S_N(X_i) |$. Então, se D é maior que o valor crítico, rejeitamos a hipótese de normalidade dos dados com $(1-\alpha)100\%$ de confiança. Caso contrário, não rejeitamos a hipótese de normalidade (BUSSAB & MORETTIN, 1987).

2.5.6 Testes Paramétricos

Os testes paramétricos visam analisar a variabilidade dos resultados da variável dependente, em função da manipulação das variáveis independentes, de forma a que se possa rejeitar ou aceitar a hipótese nula. Para a utilização dos testes paramétricos, os resultados experimentais devem ser mensurados em escalas intervalares, devem seguir a curva normal, e deve haver homogeneidade da variância.

2.5.6.1 Teste t de Student para duas amostras independentes

Quando existem duas condições e é necessário saber se as diferenças entre as médias das amostras são grandes o suficiente de modo que se possa concluir que essas diferenças ocorrem somente por causa da influência da variável independente, utiliza-se o teste t de Student. Esse teste avalia as diferenças significativas entre as médias μ_1 e μ_2 .

As hipóteses seguem a seguinte estrutura:

$H_0: \mu_1 = \mu_2$, não existe diferença entre as médias das populações.

$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$, existe diferença entre as médias das populações.

Portanto, se o resultado do teste for, em valor absoluto, maior ou igual ao valor crítico ao nível de significância estipulado, rejeita-se H_0 .

O teste t de Student possui grande aplicação em situações onde o tamanho da amostra é pequeno e as variâncias da população são desconhecidas (MAGALHÃES & DE LIMA, 2001).

2.5.6.2 Análise de Variância (ANOVA)

A análise de variância é uma ferramenta útil quando a comparação entre várias médias se torna necessário. Distribuição normal entre os dados e homogeneidade das variâncias são algumas condições para aplicação do teste (BUSSAB & MORETTIN, 1987).

A ANOVA verifica se existem diferenças entre as médias dos grupos por meio da determinação da média geral, verificando o quão diferente cada média individual é da média geral. Considerando A =número de populações ou tratamentos que serão comparados e $\mu_1, \mu_2, \mu_3, \mu_4, \dots, \mu_n$ as médias populacionais ou médias dos tratamentos, as hipóteses de interesse são:

$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \dots = \mu_n$

H_1 : Pelo menos duas médias diferentes.

2.6 Produção de Luz Síncrotron

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 emitida 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 ou LINAC 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 produzido pelo LINAC é injetado diretamente nos anéis de armazenamento através do síncrotron injetor ou em um dispositivo chamado “Booster” que é um dispositivo intermediário utilizado para acelerar as partículas fornecidas pelo acelerador linear a uma energia de cerca de milhões de elétron-volt (MeV) para energias da ordem de bilhões de elétron-volt GeV.

Este anel de armazenamento é o elemento mais importante (Figura 2.15), pois é constituído por uma sofisticada estrutura magnética, onde circulam os elétrons em uma órbita fechada, produzindo radiação síncrotron. Existem três dispositivos básicos neste anel: os dipolos magnéticos, quadrupolos ou sextupolos magnéticos e a cavidade de radiofrequência.

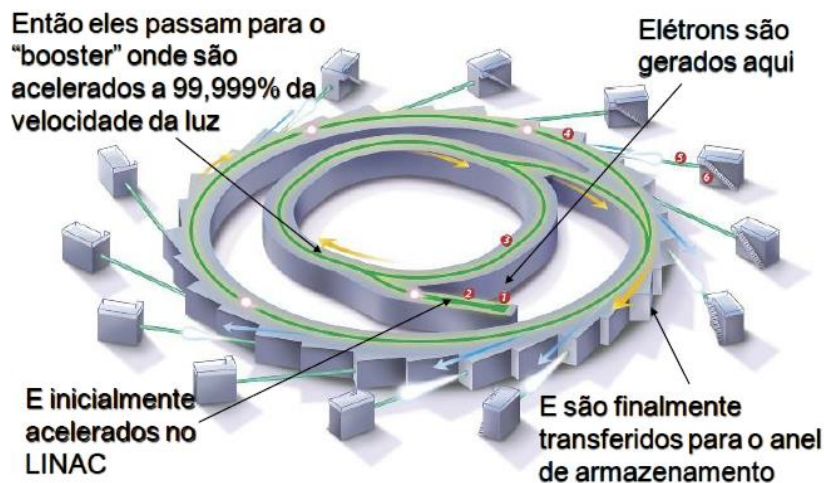


Figura 2.15: Produção de Luz Síncrotron (NOGUEIRA, 2011).

Os dipolos magnéticos (ímãs dipolares) produzem um campo magnético homogêneo no sentido vertical, sendo este responsável pela deflexão do feixe de elétrons e consequentemente a produção de radiação síncrotron. Os quadrupolos ou sextupolos, localizados nos trechos retos do anel, focalizam os elétrons e reduzem as aberrações cromáticas. Já a cavidade de radiofrequência, localizadas em um ou mais dos trechos retos do anel, 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 *et al.*, 1995).

As aplicações da radiação síncrotron são inúmeras, destacando-se seu uso na biologia, catálise em química, física de superfícies, física do estado sólido, geofísica para os estudos da composição e estruturados materiais presentes na crosta terrestre e nas indústrias com o desenvolvimento de novos materiais. As características mais importantes desta radiação está no fato, de que seu espectro é contínuo, cobrindo uma região do infravermelho até raios X duros (fóton de energia de 20.000 eV ou mais), sendo este altamente colimado, originando um feixe de elétrons com brilho excepcional, extremamente intenso e possuindo também um elevado grau de coerência espacial (TESEI *et al.*, 2005).

Além disso, com a utilização de monocromadores, é possível obter feixes praticamente monocromáticos com energias selecionáveis, dentro de um amplo espectro de energia. A natureza do feixe é laminar, com altura de alguns milímetros e com

largura de algumas dezenas de centímetros no plano do objeto, o que torna este feixe ideal para sistemas de imagens (ARFELLI *et al.*, 2000).

2.7 Câncer de Mama (CM)

Câncer é uma palavra designada para denominar um conjunto de mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem tecidos e órgãos, que podem espalhar-se (metástases) para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas). E os diferentes tipos de câncer, correspondem aos vários tipos de células do organismo e possuem fatores variados (MINISTÉRIO DA SAÚDE-INCA, 2014).

Os sintomas clínicos visíveis que indicam a presença do CM podem surgir como alterações na pele que recobre a mama, abaulamentos ou retrações, inclusive no mamilo e secreções. O sintoma palpável pode surgir a partir da detecção de um nódulo (caroço) no seio, acompanhado ou não de dor mamária e até mesmo na axila (MINISTÉRIO DA SAÚDE-INCA, 2014).

O desenvolvimento do CM, assim como outras formas de cânceres, não é proveniente de um único fator. Segundo o Instituto Nacional do Câncer, os fatores de risco podem ser caracterizados como: não modificáveis e modificáveis. Dentre os fatores de risco não modificáveis tem-se: o histórico familiar, o aumento da idade, a menarca precoce (primeira menstruação antes dos 11 anos de idade), a menopausa tardia (última menstruação após os 55 anos), a mulher nunca ter engravidado ou ter tido o primeiro filho depois dos 30 anos. Os fatores de risco modificáveis correspondem ao estilo de vida, como o excesso de peso, o uso do tabaco e a ingestão regular (mesmo que moderada) de álcool. Além desses fatores, a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses também pode ser considerada um fator de risco, particularmente durante a puberdade (MUÑOZ-TORRES *et al.*, 2009).

A intervenção cirúrgica é a estratégia mais utilizada para o tratamento de CM. De acordo com o estadiamento do tumor, esta pode ser realizada concomitantemente com a quimioterapia, hormonioterapia ou radioterapia. Em geral, aplicam-se duas ou

mais destas estratégias associadas, para obter um melhor resultado no tratamento, sendo as modalidades cirúrgicas e a radioterápicas destinadas ao tratamento loco-regional e a hormonioterapia e a quimioterapia destinada ao tratamento sistêmico (MURAD, 2000; BOUGHEY *et al.*, 2008).

2.7.1 Tratamento cirúrgico para o CM

O estadiamento clínico e o tipo histológico do CM indicam o tipo de cirurgia a qual a paciente será submetida. Historicamente, a abordagem cirúrgica padrão tem sido a mastectomia radical ou mastectomia radical modificada. Antes dos anos 80, o tratamento cirúrgico padrão envolvia somente a mastectomia radical, ou seja, a retirada completa da mama. Durante a década de 80, ocorreu uma transição gradual do tratamento baseado na mastectomia para o tratamento funcional conservador da mama. Dois estudos randomizados realizados na Itália e nos Estados Unidos demonstraram que a remoção apenas do câncer, e irradiação do restante da mama, chamado de cirurgia conservadora da mama, resultou em sobrevivência equivalente à mastectomia radical. Desta forma, a transição para o tratamento conservador da mama passou a ser utilizado, consistindo na excisão do tumor primário e do tecido normal adjacente à mama, com ou sem dissecação dos linfonodos axilares, seguido de radioterapia. Estudos randomizados sugeriram também a melhoria da qualidade de vida e satisfação para mulheres tratadas desta forma (VERONESI *et al.*, 1981, FISHER *et al.*, 1985). Ensaio prospectivos randomizados avaliaram a mastectomia parcial ou quadrantectomia isolada versus a mesma cirurgia mais radiação. Todos demonstraram uma significativa redução na incidência de recorrência na mama com o acréscimo de radiação da mama (WHELAN *et al.*, 2004, TIEZZI *et al.*, 2007, ADAMOWICZ *et al.*, 2009).

2.7.2 Hormonioterapia

A terapia hormonal adjuvante é frequentemente utilizada, associada à terapia local, para diminuir os riscos de recorrência e metástases a distancia. Normalmente, são produzidos no organismo humano, vários tipos de hormônios responsáveis, por

exemplo, pelo crescimento dos mais diversos tipos de células. O estrogênio é um desses hormônios, responsável pelo desenvolvimento feminino, possuindo uma multiplicação celular sistemática e organizada. Entretanto, se esta proliferação celular, estimulada por diversos fatores, inclusive hormonais, ocorre de forma descontrolada, pode acarretar no aparecimento de câncer, em especial do CM. Assim, uma das formas de inibir o crescimento das células mamárias neoplásicas é eliminar a produção de hormônios femininos, principalmente o estrogênio. A terapia hormonal só é empregada para CM, em pacientes que possuem células que apresentam positividade para receptores hormonais. A ligação entre estrógenos e o crescimento do CM serviu como incentivo para o desenvolvimento de tratamentos antiestrogênicos, levando a um importante avanço terapêutico. O tamoxifeno, um modulador seletivo do receptor de estrogênio, é administrado às pacientes que apresentam tumores com receptores hormonais positivos. Estudos mostram que este tipo de terapia aumenta significativamente a sobrevida média em 10 anos destas mulheres, além de diminuir a incidência de CM contralateral (EARLY *et al.*, 2001, ARNAL *et al.*, 2012).

2.7.3 Radioterapia

A cirurgia é capaz de remover tumores locais detectados, ou ainda linfonodos comprometidos, entretanto células cancerígenas podem permanecer no local da cirurgia (no tecido mamário remanescente, na cicatriz, nos linfonodos regionais, na parede torácica), ou ainda em locais mais afastados e, se não forem eliminadas podem constituir um novo tumor. No mundo, aproximadamente 50% das pacientes para CM recebem radioterapia (RT) para tratamento de CM, totalizando mais de 500.000 pacientes que recebem RT por ano. O objetivo desta modalidade é destruir as células remanescentes após a cirurgia ou reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia (LANGLANDS *et al.*, 2013).

Para a eliminação das células neoplásicas, a RT utiliza a radiação ionizante, principalmente através de feixes de fótons ou elétrons. As células neoplásicas são mais sensíveis à radiação ionizante por apresentarem alta taxa de divisão, sendo a molécula de DNA é o alvo crítico para o dano induzido pela radiação ionizante, em que de forma direta ou indireta, acarreta diferentes tipos de danos genéticos, como quebras simples ou

duplas na molécula de DNA, alterações de bases e ligações DNA-DNA e DNA-proteínas (WARD *et al.*, 1990, SHURYAK *et al.*, 2009, JAHAN *et al.*, 2013).

A teleterapia é a estratégia de RT mais utilizada, sendo a fonte de radiação externa ao paciente, a uma distância em média de 80-100 cm. Usualmente, o tratamento dura em média 5-6 semanas, totalizando 45-50 Gy em doses diárias fracionadas de 1.8-2.0 Gy, sendo ele iniciado seis semanas após a cirurgia. Entretanto em caso de tumores em estádios mais avançados, a RT pode ser utilizada para reduzir o tumor antes de cirurgia, ou ainda de forma paliativa para melhorar a qualidade de vida de pacientes terminais. As técnicas de RT tem se tornado cada vez mais eficazes, sempre visando o aumento da dose no tumor, e diminuindo as doses nos tecidos sadios vizinhos (DAYES *et al.*, 2012, TSANG *et al.*, 2012, NG *et al.*, 2012).

A RT reduz o risco de recorrência local em 50 a 70%, quando aplicada adjuvante à cirurgia conservadora, sendo a RT indicada a todas as pacientes com cirurgia conservadora, e a pacientes submetidas à mastectomia com tumor maior que 5 cm, ou que invade pele ou músculo; ou mais que três linfonodos positivos; ou linfonodos com extravasamento extracapsular (COSAR *et al.*, 2011).

2.7.4 Quimioterapia

Os primeiros registros de tratamento quimioterápico datam o final do século XIX, com a descoberta da solução de Fowler (Arsenito de Potássio) por Lissauer em 1885 e da toxina de Coley (combinação de produtos bacterianos, em 1890). Entretanto, existem evidências da utilização destes agentes desde o século I d.C, quando Dioscorides utilizou a colchicina para o tratamento de tumores iniciais. Durante a Segunda Guerra Mundial, foram identificadas substâncias citotóxicas, como o gás de mostarda, utilizados em pacientes com linfoma de Hodking e leucemia crônica, obtendo regressão de curta duração. Desta forma, muitos compostos têm sido utilizados no tratamento do câncer e atualmente, são empregadas cerca de 50 agentes quimioterápicos para o tratamento oncológico. E ainda hoje, existem pesquisas avançadas direcionadas a descobrir novos compostos assim como solucionar esquemas mais eficientes, que possuam menor grau de toxicidade dos compostos já conhecidos no mercado (ALMEIDA, 2004, BONASSA, 2005).

A quimioterapia antineoplásica é umas das principais modalidades de tratamento para o CM, e consiste na utilização de agentes químicos, de forma isolada ou em combinação, com o objetivo de tratar tumores malignos. Essa forma de tratamento tem sido a mais indicada para o tratamento das neoplasias que são diagnosticadas em estádios avançados, apresentando ou não metástases *in situ* ou à distância (MINISÉRIO AS SAÚDE-INCA, 2011). A QT pode ser empregada com a finalidade curativa ou paliativa. Desta forma, o tratamento quimioterápico é classificado em: neo-adjuvante, adjuvante e paliativo, de acordo com o objetivo do tratamento. A quimioterapia neo-adjuvante é indicada para a redução de tumores loco-regionais, em estados avançados, antes da realização da cirurgia, com a finalidade de tornar os tumores ressecáveis ou de melhorar o prognóstico do paciente. A QT adjuvante é indicada após o tratamento cirúrgico curativo, em que os pacientes candidatos a este tipo de tratamento são considerados de alto risco, face à capacidade de disseminação de seus tumores, com finalidade de aumentar o intervalo livre de doença e a sobrevida dos pacientes. E por fim, a QT paliativa, a qual é indicada unicamente para a palição de sinais e sintomas que comprometem a capacidade funcional do paciente. Possui duração limitada, tendo em vista a incurabilidade do tumor (MINISÉRIO AS SAÚDE-INCA, 2011).

Os antibióticos antitumorais representam um grupo de compostos antimicrobianos produzidos pelo *Streptomyces* em cultura. A citotoxicidade desses agentes, que limita sua utilidade antimicrobiana, mostrou-se de grande valor no tratamento de uma ampla variedade de neoplasias. O principal antibiótico antracíclico antineoplásico é a doxorrubicina. Este fármaco atua no ciclo celular, interferindo na síntese dos ácidos nucléicos por meio de um processo denominado intercalação, que impede a duplicação e a separação das cadeias de DNA (GILMAN, 2004).

Os taxanos, plactaxel e docetaxel, são derivados da casca do teixo. Estes estabilizam os microtúbulos formados, impedindo sua despolimerização, necessária à replicação celular, bloqueando, assim, o processo de divisão celular. Para que ocorra o processo de divisão celular, é extremamente necessária a presença dos microtúbulos, pois são utilizados pelas células para formar uma estrutura chamada de citoesqueleto, o qual dá forma à célula e determina a posição das organelas. Os microtúbulos possuem propriedades dinâmicas, que são utilizadas para transmitir sinais celulares, reorganizar organelas, proporcionar mobilidade às células, intervir no processo de secreção celular e na comunicação neuronal, o que explica sua abundância nos neurônios. E são

considerados importantes alvos celulares para a atuação de agentes quimioterápicos, devido à sua versatilidade, uso e importância no crescimento celular. Em presença do docetaxel, ocorre uma estabilização das tubulinas, principal componente dos microtúbulos, pela intercalação destes fármacos à estrutura do microtúbulo impedindo a sua despolimerização (VAISHAMPAYAN *et al.*, 1999).

Os agentes alquilantes, descritos primeiramente por Arnold e Bourseaux, em 1958, são outra classe de quimioterápicos, comumente utilizados em associação com os taxanos, no tratamento do CM, como por exemplo a ciclofosfamida. Estes agentes, doadores de radicais alquila, são fármacos que após sua ativação, formam ligação covalente cruzada com as moléculas de DNA. O átomo de Nitrogênio 7 da guanina é particularmente susceptível à formação de ligação covalente com os agentes alquilantes, sendo portanto o principal alvo. Outros átomos nas bases purínicas e pirimidínicas, como os nitrogênios 1 e 3 da adenina, o 3 da citosina, e o oxigênio 6 da guanina, também podem ser alquilados, mas em menor grau. Esta alquilação danifica seriamente a molécula de DNA e deve ser reparada, e caso isso não seja possível, a célula entra em apoptose.

As células sadias também são afetadas pela ação da ciclofosfamida, entretanto apresentam um efeito menor sobre estas células, uma vez que elas dividem-se mais lentamente, e são mais capazes de reparar quebras de DNA quando comparadas com as células neoplásicas. A ciclofosfamida é incluída em aproximadamente 90% dos casos na QT adjuvante para CM, sendo muito eficaz no tratamento do tumor, mas não na prevenção da recorrência, por isso é necessário associá-la sempre a outros fármacos, como o docetaxel ou a doxorubicina (KONDO *et al.*, 2010, MUNZONE *et al.*, 2012, CHIBBER *et al.*, 2013).

2.7.5 Menopausa, diminuição do hormônio estrogênio e seu efeito no osso

A menopausa está associada a perda óssea devido à diminuição da função ovariana nas mulheres, que leva à diminuição da secreção de estrogênio. Durante a menopausa o nível de β -estradiol plasmático diminui em 85-90% do nível médio presente na pré-menopausa. A reabsorção óssea aumenta em aproximadamente 90%

após a menopausa, enquanto que a formação óssea aumenta em torno de 45%. A diferença entre reabsorção e formação óssea favorece a reabsorção, o que leva a uma perda óssea acelerada durante os primeiros 8-10 anos após menopausa. O aumento da reabsorção óssea leva ao efluxo de cálcio dos ossos para o sangue (CLARKE & KHOSLA, 2010). Desta forma, a menopausa também está estritamente correlacionada com o remodelamento ósseo. HERMANN *et al.*, (2008) mostrou em seu artigo, que durante a transição para a menopausa, inicialmente ocorrem alterações no remodelamento ósseo levando a diminuição da formação óssea que posteriormente é responsável por um aumento na reabsorção óssea.

O declínio da função ovariana na menopausa resulta em diminuição da produção de estrogênio e um aumento paralelo do Hormônio Folículo Estimulante (FSH). O estrogênio diminui a reabsorção óssea e aumenta a formação óssea em mulheres da puberdade à menopausa, sendo este responsável pelo aumento da DMO (FALONI, 2007). O efeito combinado da privação de estrogênio e da elevação de FSH causa uma estimulação da reabsorção óssea, acarretando uma perda óssea, responsável pelo desenvolvimento de osteoporose na pós-menopausa. Nesta fase inicial da perda óssea ocorre a perda de osso cortical, devido ao incompleto preenchimento das cavidades reabsorvidas, em razão da diminuição da atividade dos osteoblastos, em que o aumento da quantidade de osteoclastos é o mecanismo chave pelo qual a perda óssea ocorre (PACIFICI, 2012).

A deficiência estrogênica ocasiona a perda óssea em decorrência do desequilíbrio da remodelação óssea, que determina maior absorção em relação à neoformação óssea (MANOLAGAS, 2000). Esta deficiência também é responsável pelo aumento da ativação do receptor de RANKL que leva ao aumento do recrutamento e ativação de osteoclastos e diminuição de apoptose dos mesmos. A presença de estrogênio modula a produção de outras citocinas que por sua vez controlam a atividade dos osteoclastos de forma parácrina. O estrogênio suprime a produção de citocinas de reabsorção óssea como interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e prostaglandinas. O estrogênio também aumenta a produção de fator transformante de crescimento beta (TGF- β) que induz apoptose de osteoclastos, estimula diretamente a apoptose de precursores de osteoclastos e algumas evidências sugerem que o aumento do FSH sérico cause perda óssea independente dos níveis de estradiol séricos

(CLARKEI & KHOSLA, 2010). O estrogênio também impede a degradação da matriz óssea, devido sua atuação sobre a catepsina K e a MMP-9 (metaloproteinase-9), que são proteases produzidas por osteoclastos (PARIKKA *et al.*, 2001).

O hormônio estrogênio assim como a vitamina D estimula a absorção de cálcio intestinal e a privação de estrogênio reduz a absorção intestinal de cálcio, e se a quantidade suficiente de cálcio não é suprida na dieta, isso resultará em um balanço negativo de cálcio. Conseqüentemente isso acarretará hiperparatireoidismo secundário, aumento do remodelamento ósseo, diminuição da DMO e aumento do risco de fraturas. Como a absorção intestinal é dependente de vitamina D, está também deverá ser suprida (BOUXSEINS, 2003).

CAPÍTULO 3 - MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados e preparação das amostras

Neste trabalho foram utilizados ratas da espécie *Rattus norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, clinicamente saudáveis, do laboratório LCR. Os animais foram acondicionados em grupos de cinco animais por gaiolas, cada gaiola medindo 50 x 32 x 17 cm³ e mantidos em condições ambientais de temperatura (25°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*. Os animais foram manuseados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UERJ, através do processo de número CEA/010/2012.

O grupo tratado (G1) recebeu doses do poliquimioterápico docetaxel + ciclofosfamida - TC, administrado pela via intraperitoneal, sendo os animais previamente anestesiados com Ketamina/Xilazina (1 mL/g), enquanto que o grupo tratado (G2) recebeu doses do poliquimioterápico doxorrubicina + ciclofosfamida - AC, administrado na mesma via que o G1. Estas doses foram administradas em 4 ciclos, com intervalos de 7 dias entre estes, para que fosse equivalente ao tratamento aplicado às mulheres, em que o intervalo entre os ciclos são em média de 21 dias. Este intervalo entre os ciclos considera a recuperação dos tecidos normais, apreciando o tempo para que não ocorra a retomada do crescimento tumoral. Desta forma, ao iniciar o próximo ciclo de quimioterapia, a medula deve estar praticamente recuperada, com produção normal, ou próxima do normal, de leucócitos e níveis de glóbulos brancos no sangue periférico (REAGAN-SHAW *et al.*, 2008)

Cada animal do grupo G1 recebeu 12,5 mg/kg de docetaxel e 50 mg/kg de ciclofosfamida, enquanto que no outro grupo tratado G2, cada animal recebeu 2,5 mg/kg de doxorrubicina e 50 mg/kg de ciclofosfamida. A dose administrada para cada uma das drogas, em cada ciclo, foi calculada adequadamente para que fosse equivalente à dose por ciclo de quimioterapia em humanos (FDA, 2012). Ao mesmo passo, os animais do grupo controle (G0) receberam um volume da solução NaCl 0,9% equivalente a média dos dois volumes dos poliquimioterápicos aplicados aos outros grupos, o qual, também foram administrados em 4 ciclos espaçados por 7 dias. Após 1 mês de tratamento, os animais retornaram às caixas de origem e permaneceram sob observação constante até a data da eutanásia (5 meses após o tratamento). Aos 9 meses

de idade foram sacrificados através de uma injeção de KCl diretamente no coração, sendo previamente anestesiados. Os fêmures foram retirados, limpos e expostos ao ar por pelo menos 72 horas para secar.

A caracterização final do processo osteoporótico é verificada a partir de 10 meses após o tratamento das ratas, entretanto neste trabalho a análise foi realizada 5 meses após o tratamento para que fosse possível observar os efeitos colaterais tardios dos regimes TC e AC nos ossos das ratas, e por analogia evitar que mulheres tratadas por estes fármacos, atinjam um quadro de osteoporose no futuro.

As regiões investigadas no osso do fêmur, através da microtomografia computadorizada, foram a cabeça do fêmur, da qual foram calculados os parâmetros morfométricos referente à região trabecular do osso, comparando o grupo controle com o grupo tratado G1 (Figura 3.1), e a diáfise do fêmur, em que foram calculados os parâmetros morfométricos referente à região cortical do osso, comparando os grupos controle, G1 e G2 (Figura 3.2). Não foram obtidos as medidas da cabeça do fêmur do grupo G2, pois esta região já tinha sido retirada para medidas de microfluorescência.

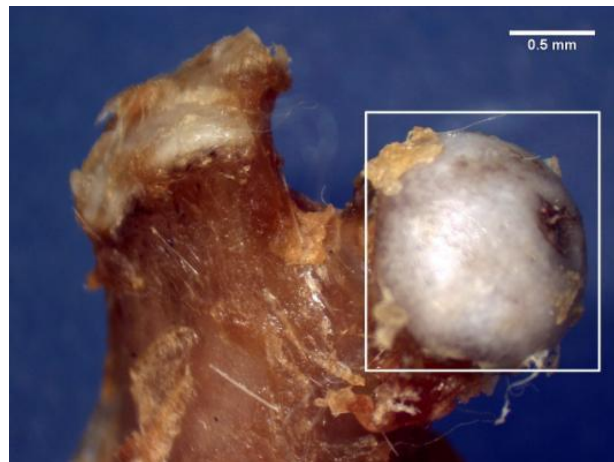


Figura 3.1: Cabeça do fêmur - região investigada referente à região trabecular (ALESSIO et al., 2014).

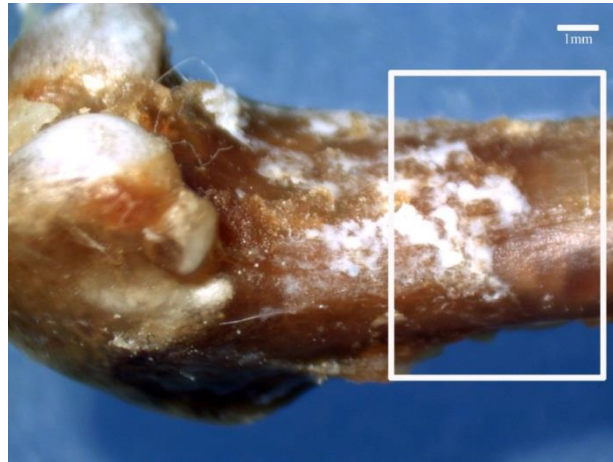


Figura 3.2: Diáfise do fêmur - região investigada referente à região cortical.

3.2 Microtomografia computadorizada

3.2.1 SYRMEP

As medidas de microtomografia foram realizadas na linha SYRMEP (**SY**nchrotron **R**adiation for **ME**dical **P**hysics) do laboratório de luz síncrotron ELETTRA, localizado na província de Trieste na Itália, sendo esta linha umas das 26 linhas do ELETTRA. 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/mm².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/mm².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.

3.2.1.1 Sistema de Detecção com Feixe Policromático

Na linha de luz SYRMEP, os elétrons que circulam o anel, emitem a radiação, quando sua trajetória é curvada pelo campo magnético do magneto curvante. E esta radiação emitida é policromática. Desta forma, para realizar as medidas microtomográficas, referente à parte trabecular da cabeça do fêmur, foram utilizados filtros de Paládio (0,047 mm) e Silício (1,5 mm) para cortar os componentes de baixa energia de raios X, obtendo uma energia média de 24 keV. Este feixe de raio X fornece uma secção laminar quase paralela a superfície com máxima secção de área de 100 mm (horizontal) x 6 mm (vertical), a uma distância de cerca de 15 m da fonte, correspondendo ao setup 1 exibido na Figura 3.3.

Uma câmera CCD *air-cooled* de 16 bit, com $2048 \times 2048 \text{ pixels}^2$ foi utilizada para o sistema de detecção e para cada amostra, foram adquiridas 1800 projeções. O intervalo angular foi de 0 a 360° , em passos angulares de $0,2^\circ$, a uma distância amostra-detector de 9 cm. A resolução alcançada para o sistema foi de $2\mu\text{m}$. A escolha do intervalo angular de 360° foi necessária para garantir que a amostra estivesse totalmente no campo de visão da câmera.

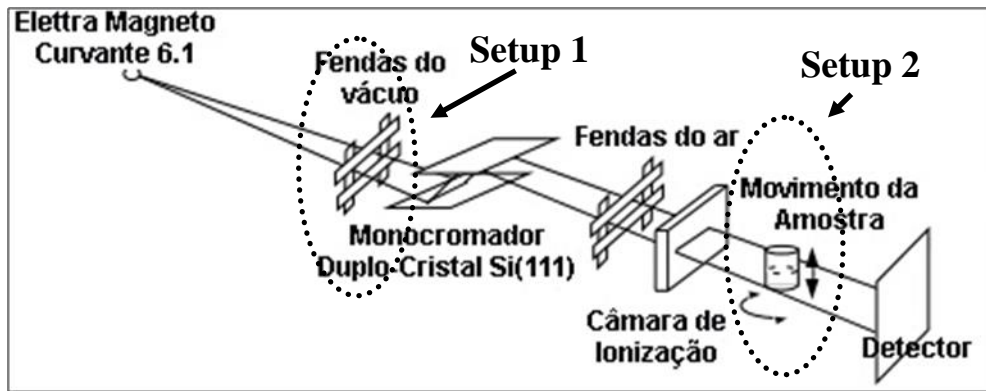


Figura 3.3: Esquema funcional da linha de luz SYRMEP.

3.2.1.2 Sistema de Detecção com Feixe Monocromático

Para as medidas da região da diáfise do fêmur, foi utilizada uma câmera *Photonic Science water cooled X-Ray Hystar 2048* de 16-bits, com $2048 \times 2048 \text{ pixels}^2$. Para cada amostra foram adquiridas 1200 projeções, em um intervalo angular de 0 a 180° , em passos angulares de $0,15^\circ$, sendo a distância amostra-detector de 6 cm. A resolução do sistema foi de $9\mu\text{m}$. Neste caso, não foi necessária a escolha de um intervalo angular de 360° , pois a amostra coube totalmente no campo de visão da câmera. Estas características correspondem ao setup 2 da Figura 3.3

Para este setup, a 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. A divergência horizontal do feixe é de 7 mrad.

Como dito anteriormente, a radiação emitida pela linha é policromática. Desta forma é necessária a seleção da componente de energia desejada, que é realizada através da difração sobre a superfície de um cristal de silício, ao que chamamos de monocromador. Um monocromador de dupla reflexão é escolhido para manter constante a direção de propagação dessa luz. 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. Para que seja possível definir as dimensões do feixe, é utilizado um sistema de fendas automático. A Figura 3.4 ilustra o aparato experimental do setup para feixe monocromático.

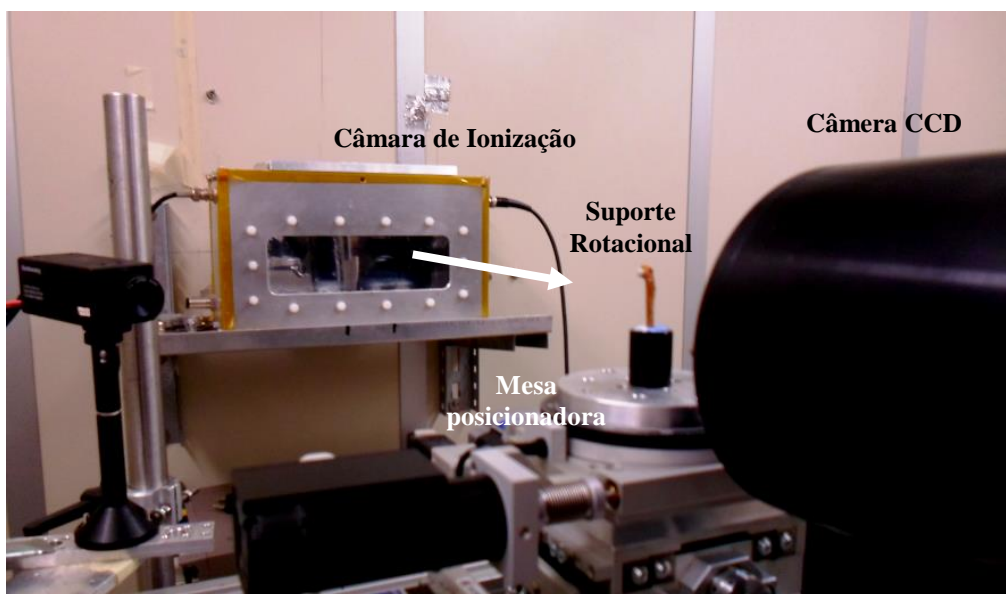


Figura 3.4: Aparato experimental da linha SYRMEP do laboratório ELETTRA, para o feixe monocromático.

Em todas as medidas (policromático e monocromático) o feixe é fixo e a aquisição das imagens é possível pelo movimento do objeto em frente ao feixe laminar. Neste sistema de posicionamento da amostra, um suporte rotacional com resolução de $(10^{-3})^\circ$ permite a realização das tomografias. A câmara de ionização (Figura 3.4) é empregada para medir a intensidade da radiação incidente sobre a amostra, sendo assim é colocada antes da mesa posicionadora de amostra, possibilitando uma estimativa da dose depositada na amostra e o controle do feixe incidente. 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 *et al.*, 2005).

3.3 Aquisição das Tomografias

O programa *Image Pro Plus v.5.1.* realiza todo o controle dos parâmetros da câmera CCD para aquisição das imagens e a sincronização com os motores *Newport* da linha. A área de captura da imagem, o tempo de exposição para cada aquisição e *binning* (Figura 3.5a e Figura 3.5b) são os parâmetros da câmera a serem definidos. Através do submenu *Image* (Figura 3.6a) 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.

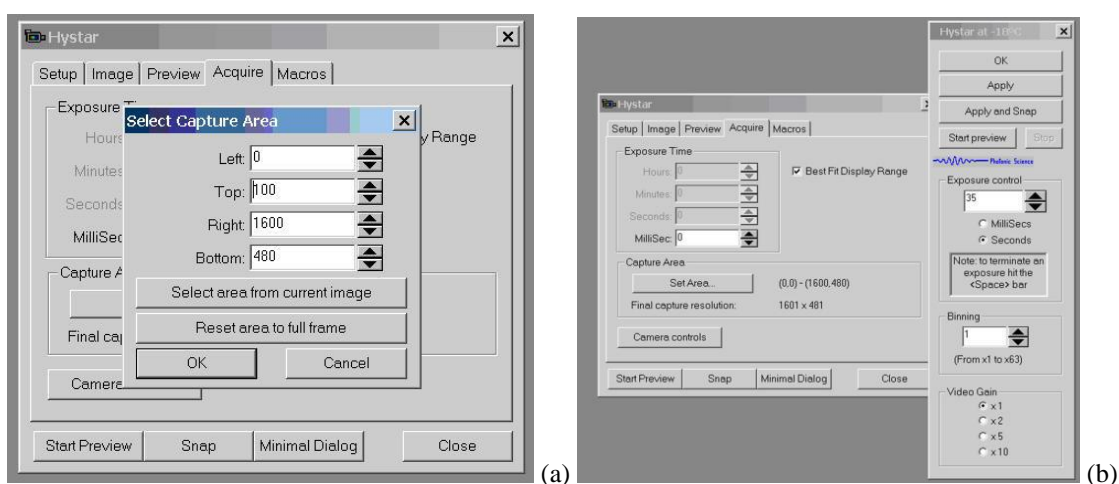


Figura 3.5: Interface do programa *Image Pro Plus*: (a) Submenu para seleção da área de captura da imagem. (b) Submenu para seleção do tempo de aquisição e *binning* da imagem.

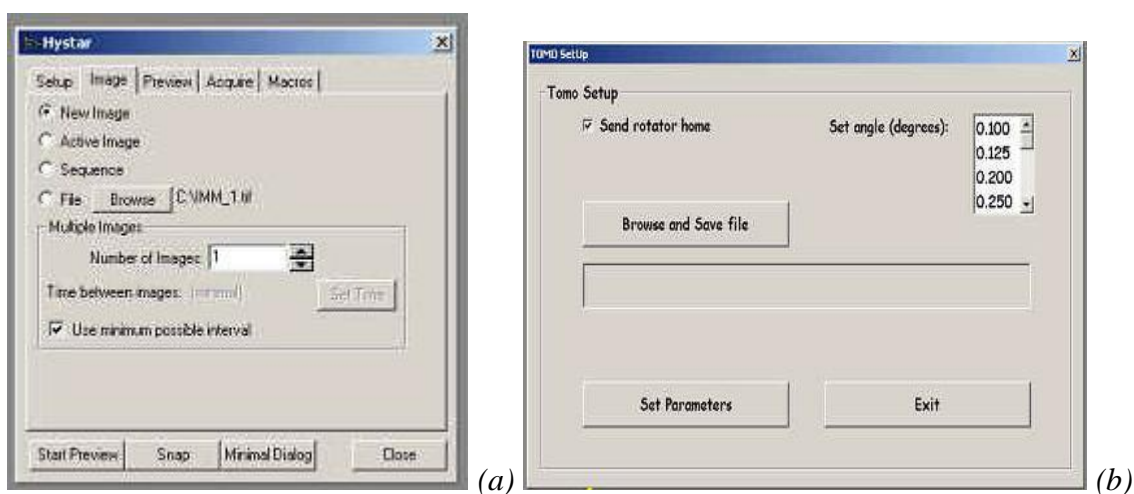


Figura 3.6: (a) Submenu para seleção do número de imagens a serem adquiridas. (b) Submenu para seleção do passo angular e destinação dos arquivos gerados.

Uma macro permite fazer girar a amostra de um dado passo angular depois de cada aquisição (Figura 3.6b), sendo o arquivo salvo na destinação definida. 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.

Após a aquisição, todas as imagens adquiridas são normalizadas a partir da relação:

$$I_{Normalizada} = \frac{I_{Amostra} - I_{Dark}}{I_{Flat} - I_{Dark}} \quad (3.1)$$

sendo $I_{Amostra}$ a imagem da amostra capturada pela câmera CCD após definidos todos os parâmetros experimentais; I_{Dark} imagem capturada pela câmera CCD sem feixe e com o *shutter* fechado e I_{Flat} a imagem capturada pela câmera CCD com o *shutter* aberto e sem a amostra na frente do feixe.

A Figura 3.7 mostra um exemplo de cada uma dessas imagens obtidas para uma amostra da parte da diáfise do osso de fêmur do rato. As imagens I_{Dark} e I_{Flat} são médias calculadas a partir de um conjunto de 5 imagens obtidas antes e depois da aquisição de todas as projeções.

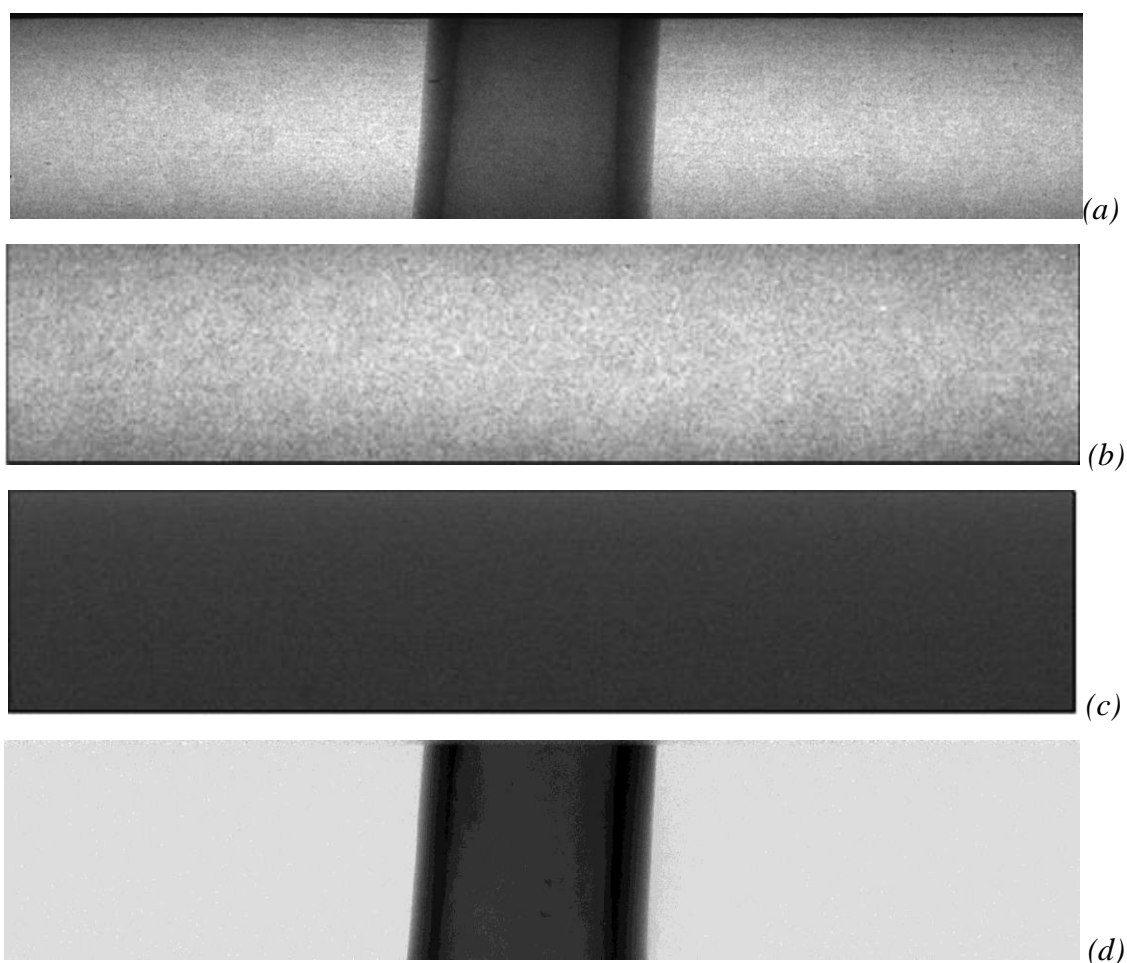


Figura 3.7: (a) Imagem da amostra. (b) Imagem flat. (c) Imagem dark (d) imagem normalizada.

3.4 Reconstrução das Imagens Tomográficas

O procedimento de reconstrução das imagens foi realizado em um ambiente computacional completo para análise interativa e visualização de dados, o qual desenvolvido pelo grupo SYRMEP no IDL (Interactive Data Language). Este programa reúne uma 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 de um procedimento de reconstrução utilizando retroprojeção filtrada (MONTANARI, 2003). O procedimento consiste inicialmente em exibir uma única projeção normalizada e para cada projeção um mapa de intensidades é gravado no plano xy do detector. Em seguida, seleciona-se interativamente um *slice* do qual se

deseja construir o sinograma (Figura 3.8a), ao mesmo passo é escolhido um 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. Após estes procedimentos, define-se a largura do *slice* a ser reconstruído na imagem do sinograma, sendo definido os limites esquerdo e direito (Crop Left Right) no sinograma, para delimitar a região que realmente contenha os dados. (Figura 3.8b). É necessário também otimizar o valor do centro de rotação, para que seja possível um sinograma mais centrado em relação ao centro de rotação, reduzindo assim o aparecimento de artefatos nas imagens. Finalmente, depois de otimizados os parâmetros tomográficos, todos os sinogramas podem ser criados e os *slices* podem ser reconstruídos, sendo estes utilizados para a reconstrução 3D onde os *slices* 2D são visualizados como uma pilha (*stack*).

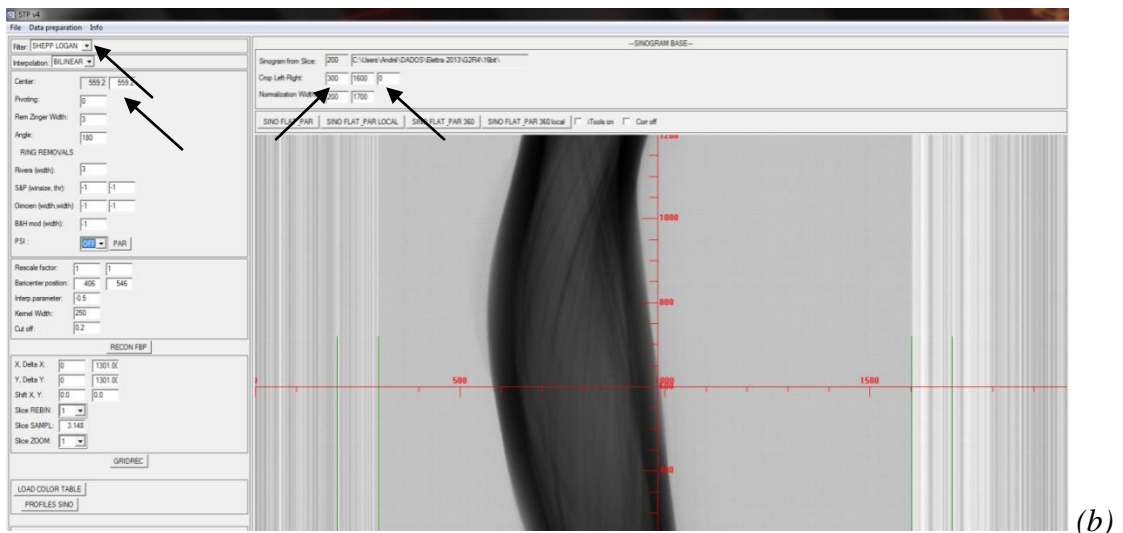
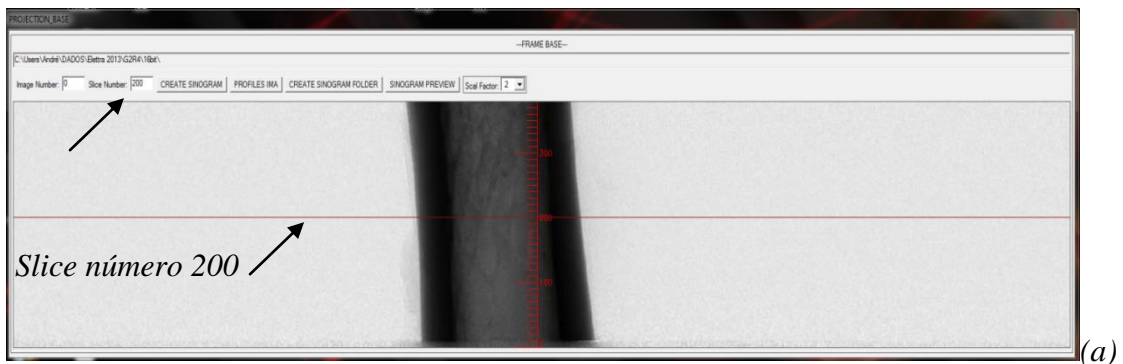


Figura 3.8: (a) Janela do programa de reconstrução mostrando um exemplo de projeção e a escolha do slice na imagem. (b) Sinograma do slice escolhido definindo os limites esquerdo e direito e o filtro usado.

3.5 Quantificação das Amostras de Osso

Para a obtenção dos parâmetros histomorfométricos referentes à região trabecular da cabeça do fêmur foi selecionado um conjunto de imagens de cada microtomografia contendo um total de 500 *slices*, selecionados exatamente a 200 *slices* abaixo do topo da cabeça do fêmur. Cada *stack* (conjunto de *slices*) foi recortado em dimensões de 200 x 158 *pixels*², o que garantiu que todas as amostras contivessem somente o osso trabecular e que todas as amostras contivessem um volume de 200 x 158 x 500 *pixels*³ (Figura 3.9).

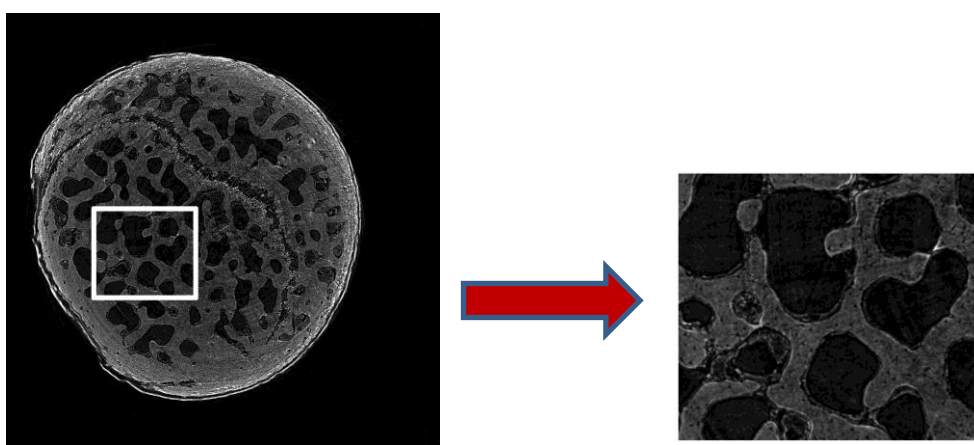


Figura 3.9: Região selecionada na imagem para quantificação da região trabecular da cabeça do fêmur.

Para a obtenção dos parâmetros morfométricos referentes à região cortical da diáfise do fêmur, foi selecionado um conjunto de imagens de cada microtomografia contendo um total de 350 *slices*. Foram selecionadas 4 regiões (Figura 3.10), contendo cada uma, um *stack* de dimensões de 18 x 17 x 350 *pixels*³, sendo o cálculo de cada parâmetro cortical realizado nestas quatro regiões em cada amostra. Uma média foi calculada para este caso.

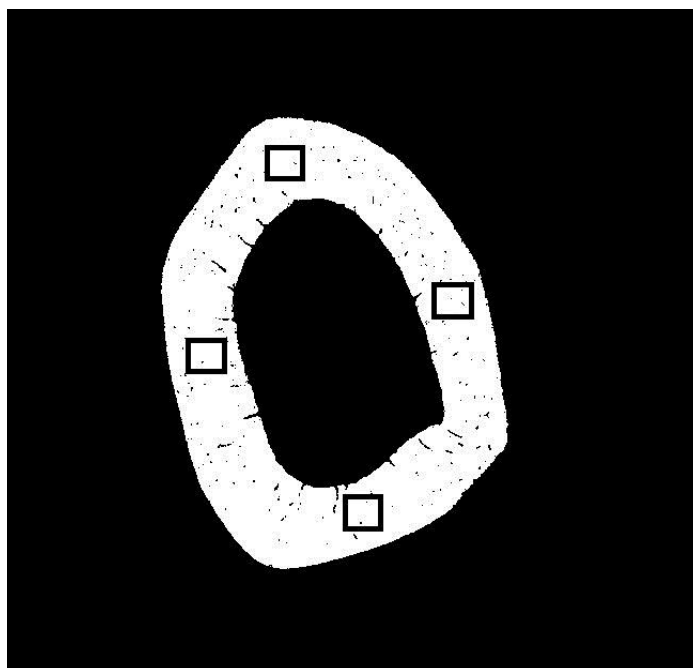


Figura 3.10: Regiões selecionadas na imagem binarizada para quantificação da região cortical da diáfise do fêmur.

Estes volumes (trabecular e cortical) são salvos num arquivo no formato *.raw* contendo todos os *slices* daquela amostra, gerando desta forma, um volume com as dimensões bem definidas. A partir destas imagens, fez-se um tratamento, para normalizar o contraste entre todos os *slices* utilizando o programa *ImageJ*[®] (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Após esta etapa, realizou-se a segmentação das imagens por binarização.

A segmentação pode ser realizada antes ou depois da seleção do ROI, e para realizar a binarização 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. Desta forma, após a binarização da imagem, são fornecidas 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. O valor do *threshold* foi escolhido a partir da segmentação automática do software *ImageJ*[®] baseada no algoritmo *Isodata* iterativo, garantindo uma segmentação mais fidedigna das imagens, sem interferência humana (RIDDLER *et al.*, 1978).

Após tratamento das imagens, foi realizada a quantificação 3D, tanto dos parâmetros trabeculares quanto dos parâmetros corticais, utilizando o *software* *BoneJ* (DOUBE *et al.*, 2010), que é um *plugin* do *ImageJ*[®]. Este *plugin* é específico para a análise de imagens ósseas, que são obtidas através da tomografia e da microtomografia computadorizada. Ele é um programa gratuito e que fornece ferramentas de código para

o cálculo de parâmetros morfométricos, referentes à geometria trabecular, assim como uma análise do osso como um todo.

Os parâmetros morfométricos avaliados para a região trabecular da cabeça do fêmur foram: razão entre volume ósseo e volume total da amostra (BV/TV); a separação média entre as trabéculas (Tb.Sp, mm); a densidade de trabéculas (Tb.N, mm^{-1}), a espessura média das trabéculas (Tb.Th, mm) e o índice modelo de estrutura “Structure Model Index” (SMI). Os parâmetros analisados para a região cortical da diáfise do fêmur foram: razão do volume de poros (canais) sobre volume total ósseo (Por.Ct), espessura média dos poros (Por.Th, μm), separação média dos poros (Por.Sp, μm) e densidade de poros da amostra (Por.N, μm^{-3}).

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados deste trabalho referem-se à análise estrutural e o cálculo dos parâmetros histomorfométricos por μ TC da cabeça do fêmur (trabecular) das ratas submetidas ao tratamento quimioterápico com docetaxel e ciclofosfamida em comparação ao grupo de ratas controle. Ainda neste capítulo serão apresentados resultados referentes à análise estrutural e o cálculo dos parâmetros morfométricos por μ TC da diáfise do fêmur (cortical) das ratas submetidas ao tratamento quimioterápico com docetaxel e ciclofosfamida, doxorubicina e ciclofosfamida, em comparação ao grupo controle.

4.1 Grupo Tratado G1 (docetaxel+ciclofosfamida - TC) x Controle - Região: Cabeça do Fêmur

4.1.1- Imagens

As imagens tomográficas, obtidas com o uso da radiação síncrotron, possuem uma notável qualidade. 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. As Figuras 4.1 e 4.2 mostram os *slices* 600, 800 e 1000, exibindo diferentes profundidades de uma amostra do grupo controle e uma amostra do grupo G1, de ratas tratadas com poliquimioterápico (docetaxel + ciclofosfamida - TC), respectivamente. Estas imagens bidimensionais exibem algumas fatias da região da cabeça do fêmur.

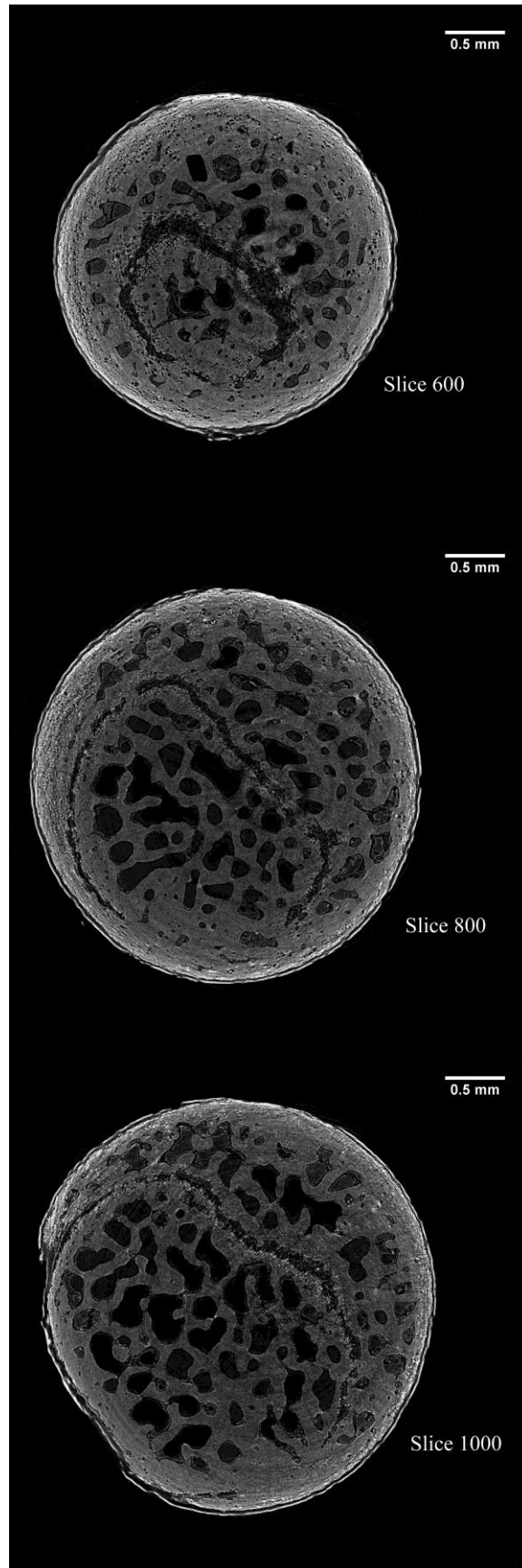


Figura 4.1: Slices de diferentes profundidades da região da cabeça do fêmur do grupo controle (G0).

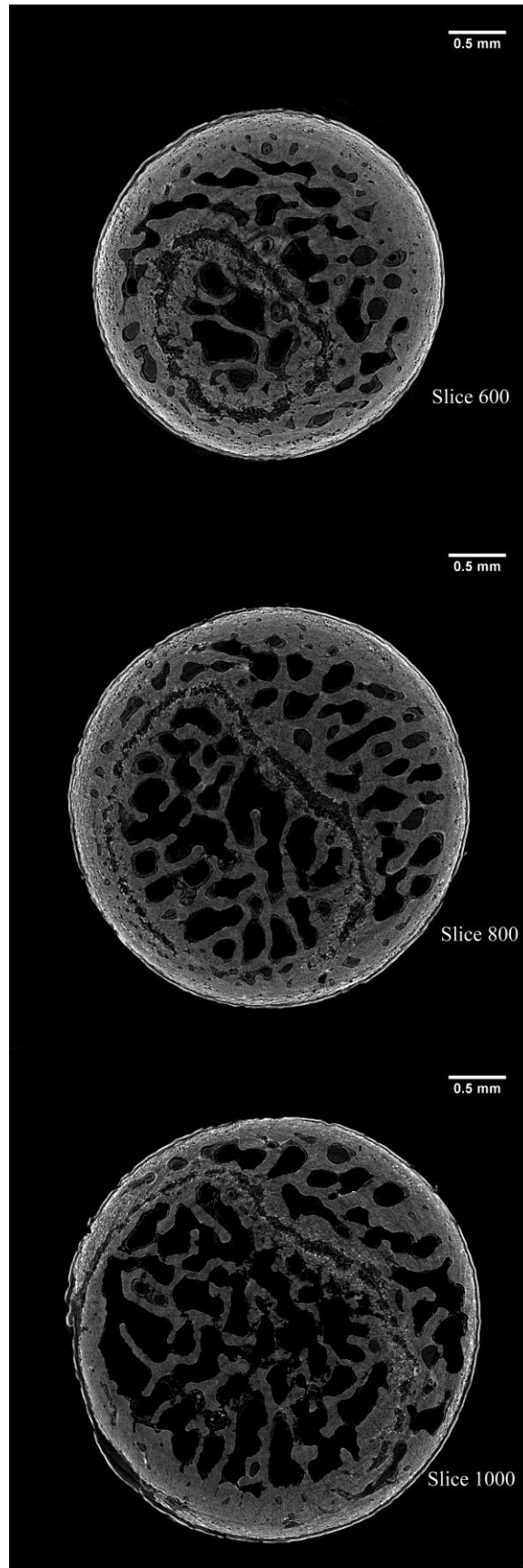


Figura 4.2: Slices de diferentes profundidades da região da cabeça do fêmur do grupo G1, tratado com poliquimioterápico (docetaxel + ciclofosfamida).

Através da análise das imagens, é possível observar uma diferença qualitativa na estrutura óssea do grupo tratado em relação ao grupo controle. É notável o desgaste ocorrido na parte trabecular do osso, a perda de massa óssea, onde as trabéculas estão mais espaçadas, e ainda a diminuição das interconexões. A Figura 4.3 ilustra a seção horizontal da cabeça do fêmur de uma amostra do grupo controle e do grupo G1 (região central da amostra), onde é possível observar também a deteriorização da parte trabecular do osso do grupo G1 em comparação ao grupo G0.

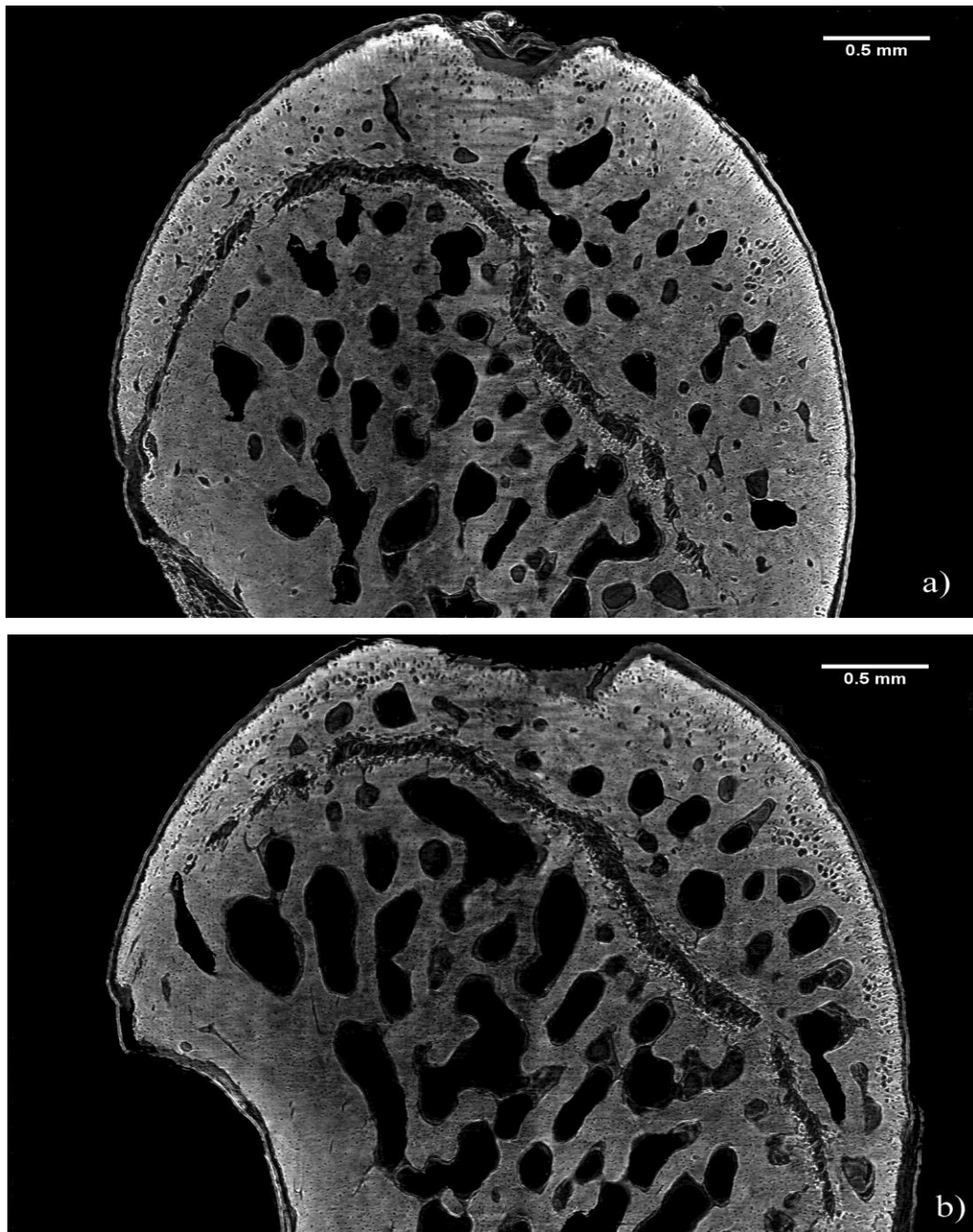


Figura 4.3: Imagem 2D (seção horizontal) da cabeça do fêmur a) grupo controle (G0) e b) grupo tratado (G1).

As imagens 3D apresentadas em diferentes ângulos permitem visualizar detalhes de diversas regiões da amostra. As imagens tridimensionais apresentadas representam a região onde exatamente foi realizada a quantificação histomorfométrica, para uma das amostras do grupo G0 (Figura 4.4) e G1 (Figura 4.5), com um volume de $200 \times 158 \times 500 \text{ pixels}^3$ cada.

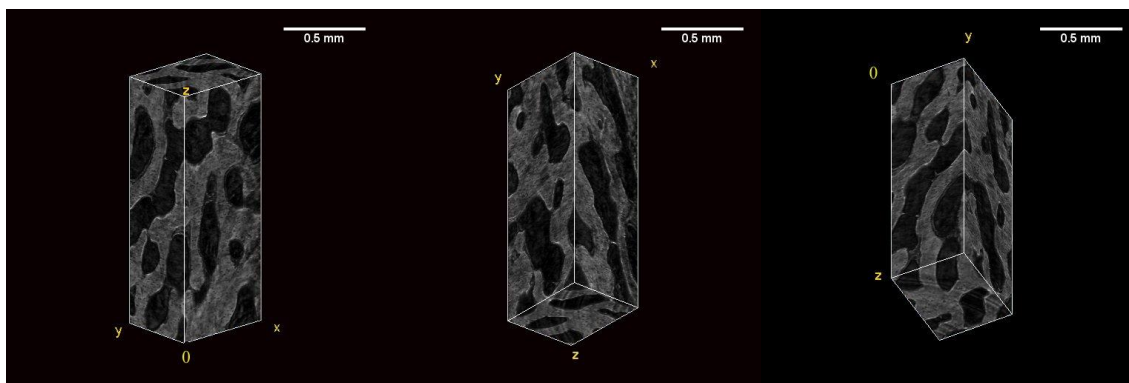


Figura 4.4: Imagens 3D em vários ângulos da região utilizada na quantificação histomorfométrica de uma amostra do grupo controle.

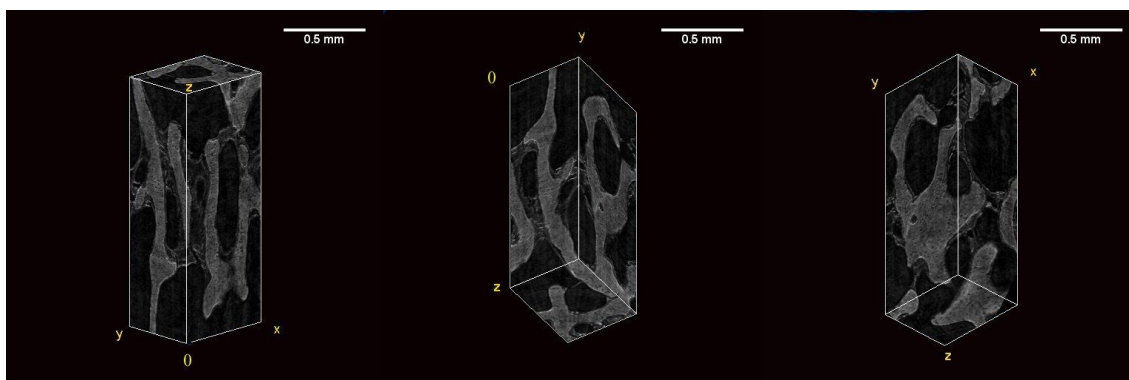


Figura 4.5: Imagens 3D em vários ângulos da região utilizada na quantificação histomorfométrica de uma amostra do grupo tratado.

4.1.2- Quantificação Histomorfométrica (Osso Trabecular)

A quantificação histomorfométrica a partir das imagens 3D por microtomografia computadorizada foi realizada em todas as amostras de controle ($n = 5$) e em todas as amostras tratadas com os quimioterápicos docetaxel + ciclofosfamida ($n = 5$), na região da cabeça do fêmur. A fim de analisar somente a parte trabecular da cabeça do fêmur, as imagens 3D utilizadas na quantificação continham 500 *slices* cada, com um volume total de $200 \times 158 \times 500 \text{ pixels}^3$, como já apresentado anteriormente. Os resultados da quantificação histomorfométrica desta primeira parte são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Índices histomorfométricos para a cabeça do fêmur.

Grupos	BV/TV (%)	Tb.Th (mm)	Tb.Sp (mm)	Tb.N (mm ⁻¹)	SMI
G0 (n = 5)	49,4 ± 1,9	0,028 ± 0,001	0,076 ± 0,008	8,454 ± 0,391	0,724 ± 0,217
G1 (n = 5)	33,9 ± 1,8	0,030 ± 0,002	0,103 ± 0,009	7,379 ± 0,412	1,840 ± 0,270
p-valor	p = 0,006 ^{a**}	p = 0,460	p = 0,063	p = 0,095	p = 0,02 ^{a*}

^aDiferença significativa em relação a G0, **a***** (p < 0,0001), **a**** (p < 0,01) e **a***(p < 0,05)

A análise estatística foi realizada através do teste t de Student (GraphPad Prism 5.03; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A partir da análise dos gráficos a seguir torna-se mais fácil notar as diferenças de cada parâmetro entre grupos de controle e o tratado com docetaxel + ciclofosfamida. Os gráficos das Figuras 4.6 a 4.10 representam os dados da Tabela 4.1.

O erro padrão das amostras é expresso em forma de barras verticais. A análise da Figura 4.6, em conjunto com o teste *t de Student*, constatou que o índice BV/TV obteve uma diminuição significativa em seu valor, na comparação dos dois grupos em questão. A razão entre o volume ósseo e o volume total da amostra diminuiu 31% (p = 0,006) no grupo G1 em relação ao grupo G0, indicando que houve uma diminuição da massa óssea, tornando assim o osso mais frágil, com uma menor resistência mecânica (CHEN & KUBO, 2014).

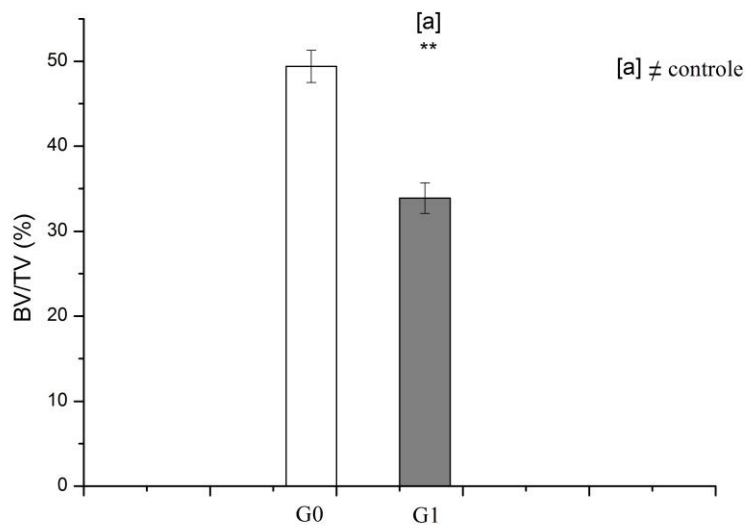


Figura 4.6: Gráfico dos valores de BV/TV referente à cabeça do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, **a**** (p < 0,01).

De acordo com a análise dos dados e do gráfico da Figura 4.7, o parâmetro (Tb.Th) espessura trabecular não apresentou diferença significativa entre os valores obtidos para o grupo tratado G1 e o grupo controle G0, apresentou um aumento de 7%, assim como o espaçamento trabecular média (Tb.Sp) aumentou 36% ($p = 0,063$), em relação ao grupo controle (Figura 4.8). Já o (Tb.N) número de trabéculas por milímetro diminuiu 13% no grupo G1 em comparação ao grupo G0 ($p = 0,095$), como mostrado na Figura 4.9.

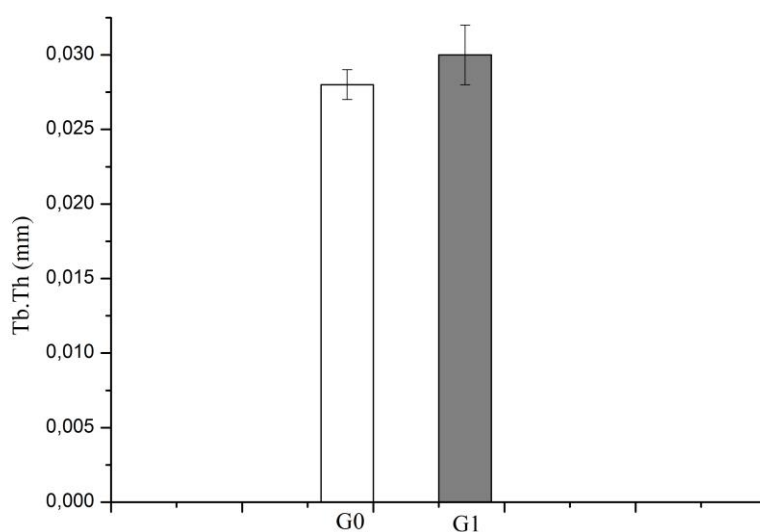


Figura 4.7: Gráfico dos valores de Tb.Th referente à cabeça do fêmur.

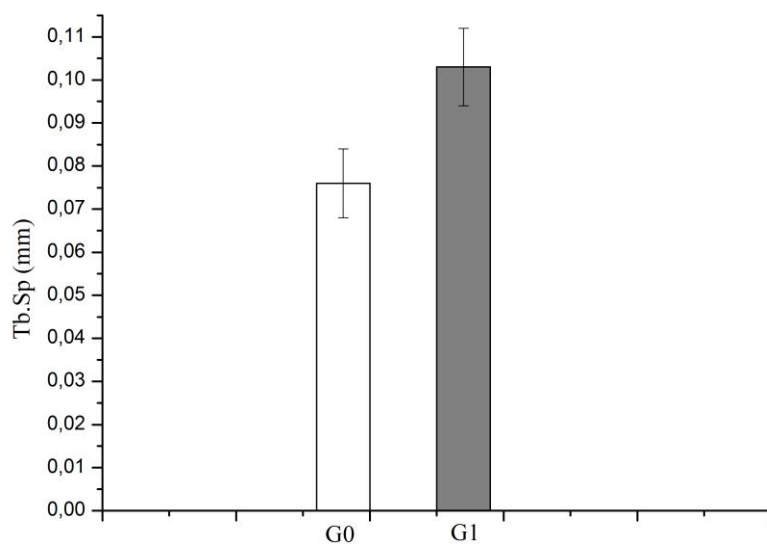


Figura 4.8: Gráfico dos valores de Tb.Sp referente à cabeça do fêmur.

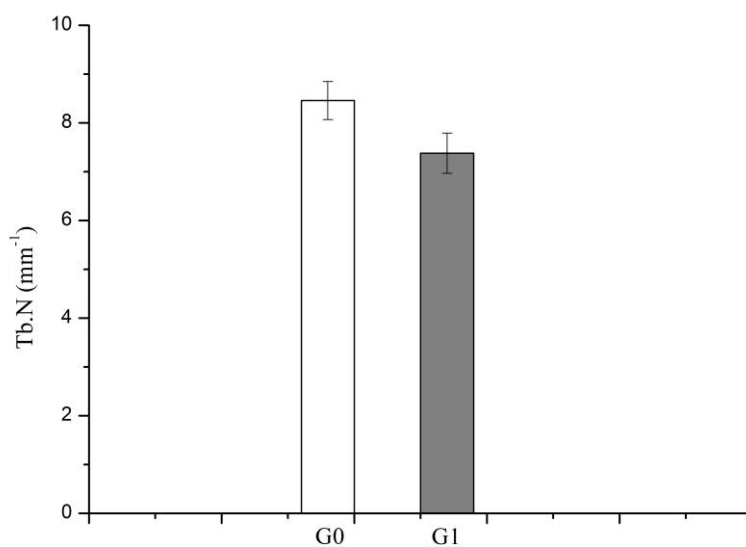


Figura 4.9: Gráfico dos valores de Tb.N referente à cabeça do fêmur.

O parâmetro SMI é uma característica importante na descrição da arquitetura trabecular, sendo este uma ferramenta que determina a resistência e a rigidez do osso. Quanto maior o número de trabéculas com a forma de haste existir no osso, menor é a resistência e a rigidez deste. A deterioração da estrutura do osso esponjoso, devido ao envelhecimento e as doenças, tais como a osteoporose, é caracterizada por este

parâmetro como uma conversão de trabéculas em forma de placa “*plate-like*” para trabéculas em forma de haste “*rod-like*”. Os termos “*plate-like*” e “*rod-like*” são frequentemente utilizados para uma classificação subjetiva de osso esponjoso (DING *et al.*, 2000). Em um estudo realizado por AKHTER *et al.* (2007), utilizando biópsias humanas na pós-menopausa, o parâmetro SMI aumentou, implicando na conversão de estruturas do formato de placa para forma de haste, durante o período de transmenopausa. Resumidamente, SMI é um parâmetro importante para analisar as mudanças ocorridas no osso trabecular, em função de algumas doenças relacionadas com a idade, como a osteoporose ou a artrose, pois o osso trabecular em forma de haste é uma característica de pacientes com osteoporose (DING *et al.*, 2000; LAIB *et al.*, 2000; HOMMINGA *et al.*, 2004; TANK *et al.*, 2009).

O grupo tratado G1 apresentou SMI médio de 1,840, indicando que as estruturas estão mais próximas da forma de haste, enquanto o grupo controle apresentou SMI de 0,724, ou seja, mais estruturas em forma de placa, o que reflete uma maior resistência mecânica do osso. Este parâmetro obteve um aumento significativo de 154% no grupo tratado G1 comparado com o grupo G0 ($p < 0,05$), como exibido no gráfico da Figura 4.10. Desta forma, é possível notar que no grupo tratado G1, o número de trabéculas que se assemelham com a forma de haste é maior do que o número de trabéculas que se assemelham com a forma de placa, revelando assim uma diminuição na rigidez e na resistência mecânica do osso do grupo tratado. Estes resultados já estão publicados em ALESSIO *et al.* (2014).

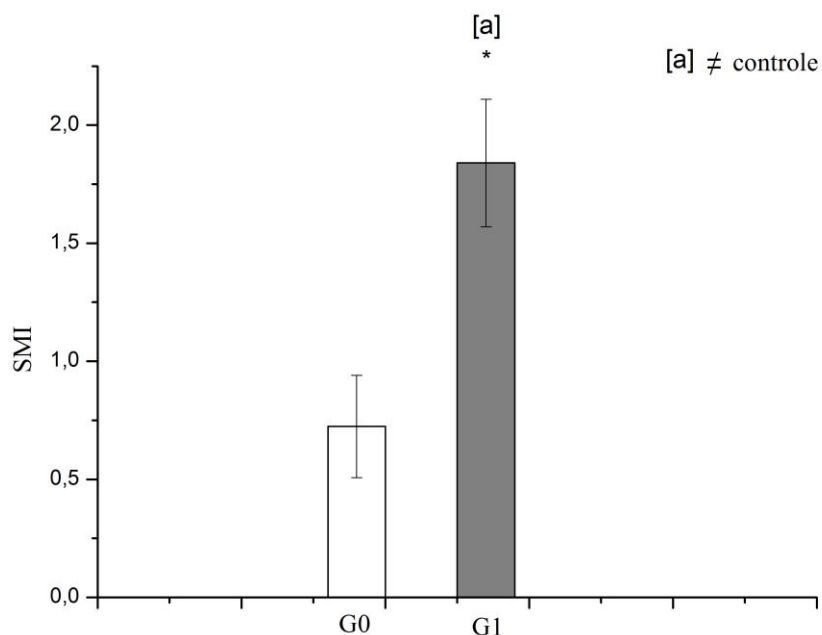


Figura 4.10: Gráfico dos valores de SMI referente à cabeça do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, $a^*(p < 0,05)$.

A ovariectomia, assim como o tratamento quimioterápico, ocasiona nas ratas a diminuição da produção de estrogênio, pois um dos efeitos destes fármacos utilizados em tratamentos quimioterápicos para o CM é a indução da amenorreia (CIA) em mulheres na pré-menopausa. Uma consequência importante da CIA, ou seja, do comprometimento da fertilidade, é a perda da densidade mineral óssea (DMO). A insuficiência ovariana, induzida pela quimioterapia, pode acarretar além da perda óssea rápida, alterações na microestrutura óssea tanto na parte trabecular do osso quanto a cortical, sendo estas alterações semelhantes às que são apresentadas em caso de pacientes com osteoporose (PEYMAN *et al.*, 2009; HADJI *et al.*, 2012). Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por TROMP *et al.*, 2006, o qual analisou os efeitos no osso trabecular da metáfise da cabeça do fêmur de ratas ovariectomizadas (OVX), ocasionados pela diminuição da produção do hormônio estrogênio. No estudo de TROMP *et al.*, 2006, a análise histomorfométrica, realizada através da microtomografia, também apresentou diminuição significativa do parâmetro histomorfométrico BV/TV para as ratas que sofreram a operação, enquanto que os parâmetros Tb.Sp e o SMI (*Structure Model Index*) tiveram um aumento significativo no grupo OVX em comparação ao grupo controle, assim como o parâmetro

Tb.Th que também apresentou um aumento do grupo OVX em relação ao grupo controle.

4.2 Grupo Tratado (docetaxel+ciclofosfamida - TC) x Grupo Tratado (doxorrubicina+ciclofosfamida - AC) x Controle - Região: Diáfise do Fêmur

4.2.1- Imagens

As imagens tomográficas referentes à região cortical da diáfise do fêmur, obtidas com o uso da radiação síncrotron com feixe monocromático, possuem uma notável qualidade. Através destas imagens tridimensionais, é possível observar o volume como um todo de uma amostra de cada grupo, assim como o sistema de canais internos. Através das figuras 4.11, 4.12 e 4.13 é possível observar uma diferença qualitativa na estrutura óssea dos grupos tratados em relação ao grupo controle. O desgaste ocorrido na região cortical do osso é evidente, assim como a perda de massa óssea, tanto no grupo G1, quanto no grupo G2, em comparação ao grupo controle.

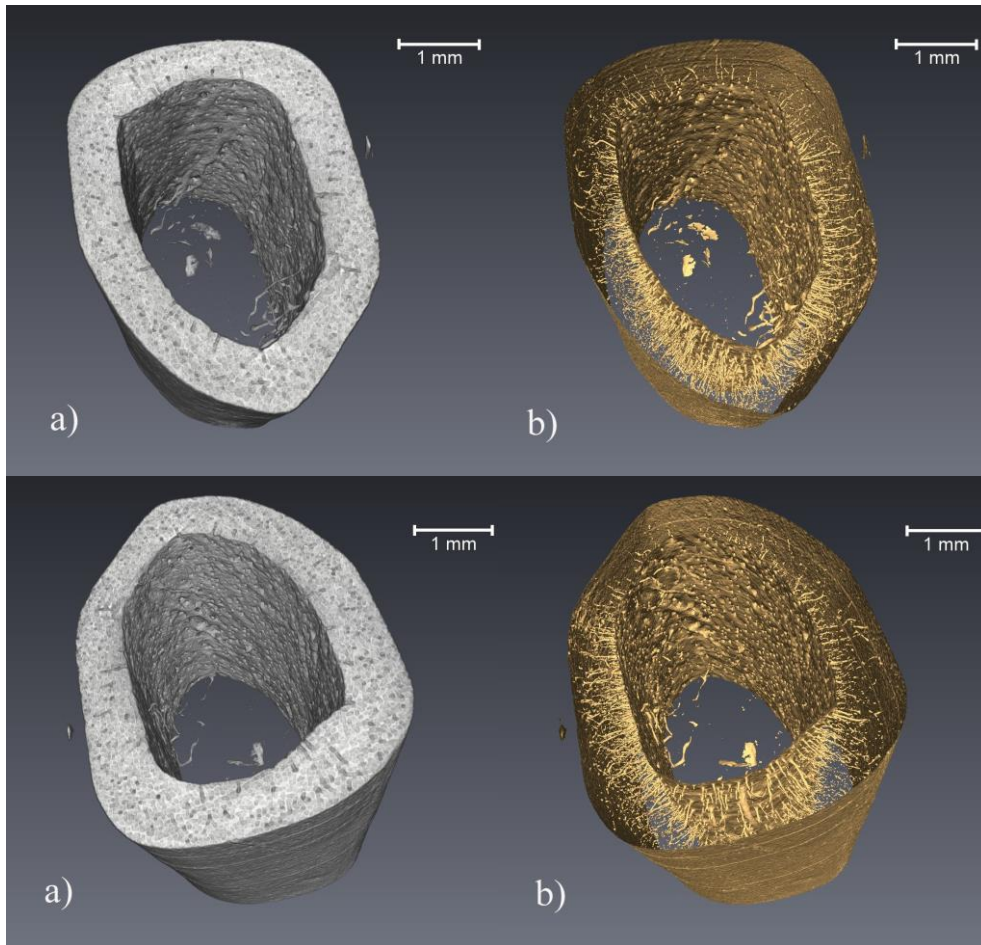


Figura 4.11: a) Imagens 3D do volume b) Imagens 3D do sistema de canais de uma amostra do grupo controle.

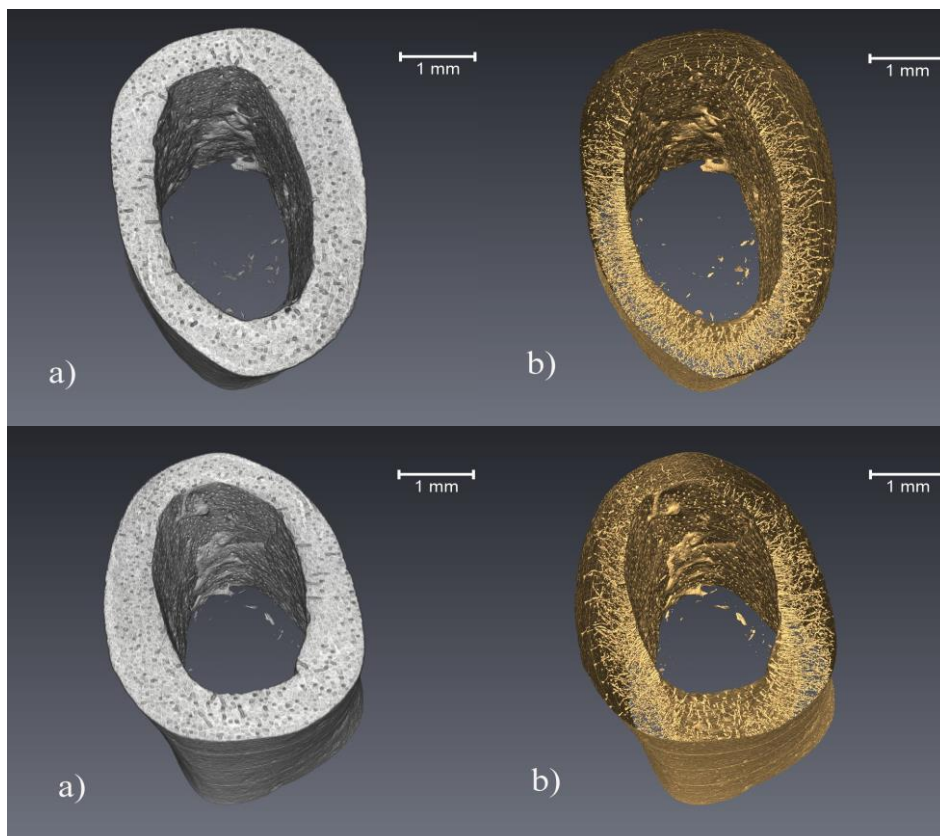


Figura 4.12: a) Imagens 3D do volume b) Imagens 3D do sistema de canais de uma amostra do grupo tratado G1.

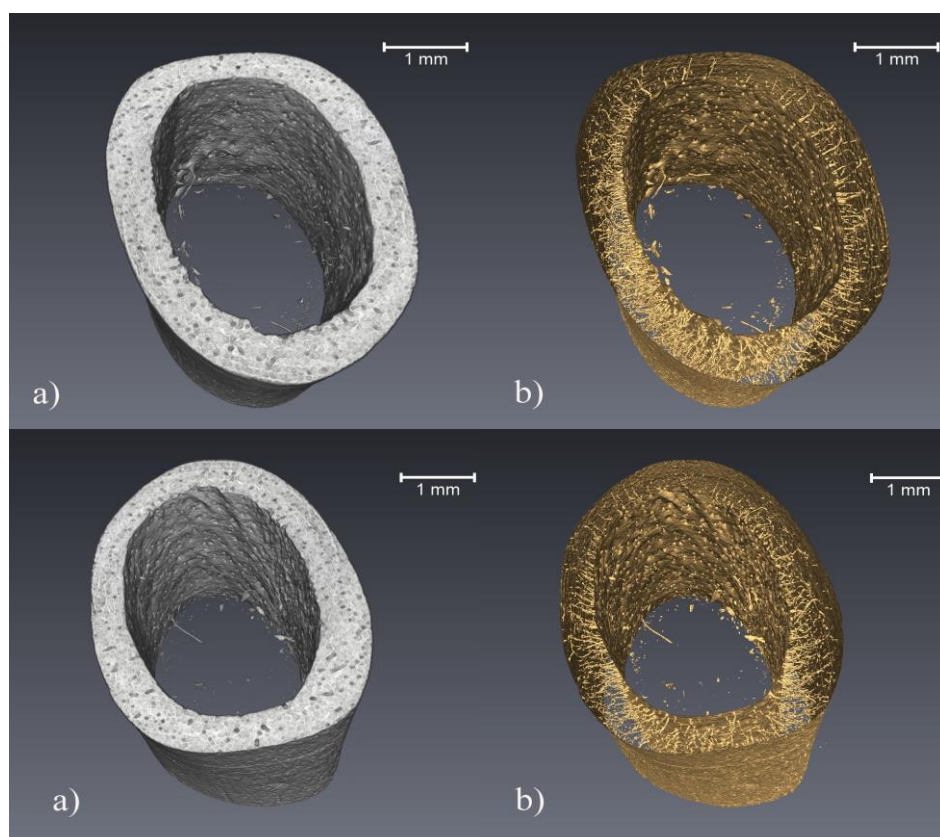


Figura 4.13: a) Imagens 3D do volume b) Imagens 3D do sistema de canais uma amostra do grupo tratado G2

As imagens 3D exibidas na Figura 4.14 permitem visualizar três ângulos diferentes de uma região quantificada (sistema de canais) do osso cortical na diáfise do fêmur de uma amostra de cada grupo. As imagens tridimensionais possuem um volume de $18 \times 17 \times 350 \text{ pixels}^3$. Uma análise minuciosa através destas imagens permite observar qualitativamente que tanto o grupo G1 e o grupo G2 possuem uma porosidade e uma densidade de poros maior que o grupo controle, assim como as espessuras dos canais do grupo tratado com o regime AC são maiores que do grupo controle e também do que tratado com o regime TC.

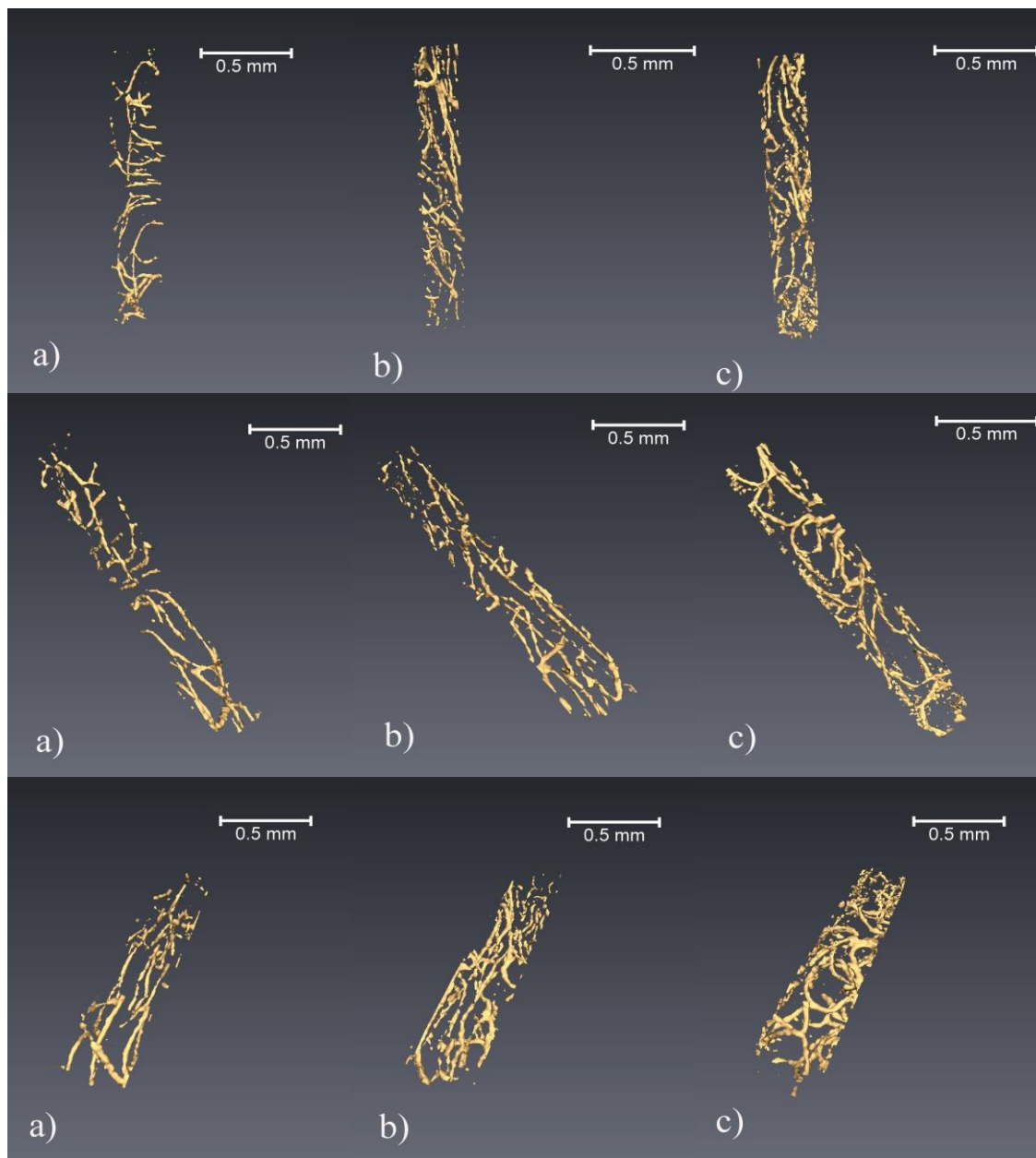


Figura 4.14: Imagens 3D de três diferentes ângulos do sistema de canais (poros) da região utilizada na quantificação da diáfise do fêmur de uma amostra dos três grupos: a) grupo controle; b) grupo G1 (TC) e c) grupo G2 (AC).

4.2.2- Quantificação dos Parâmetros Morfométricos (Osso Cortical)

A quantificação dos parâmetros morfométricos a partir das imagens 3D por microtomografia computadorizada foi realizada em todas as amostras de controle (n = 5), em todas as amostras tratadas com docetaxel + ciclofosfamida - TC (n = 5) e em todas as amostras tratadas com doxorubicina + ciclofosfamida - AC (n = 5), na região da diáfise do fêmur. A fim de analisar somente a parte cortical da diáfise do fêmur, as imagens 3D utilizadas na quantificação continham 350 *slices* cada, e cálculo de cada parâmetro foi realizado em quatro regiões em cada amostra e posteriormente foi realizada a média destes resultados. Cada região continha um volume de 18 x 17 x 350 *pixels*³. Os resultados da quantificação referente à região cortical da diáfise do fêmur são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Parâmetros morfométricos para a diáfise do fêmur.

Grupos	Por.Ct (%)	Por.Th (µm)	Por.Sp (µm)	Por.N (µm ⁻³)
G0 (n = 5)	0,78 ± 0,04	18,2 ± 0,1	239 ± 6	1,45 10 ⁻⁶ ± 0,08 10 ⁻⁶
G1 (n = 5)	1,16 ± 0,06 ^{a***}	18,6 ± 0,2 ^{a***}	204 ± 4 ^{a***}	1,76 10 ⁻⁶ ± 0,05 10 ⁻⁶ ^{a*}
G2 (n = 5)	1,23 ± 0,06 ^{a***}	19,1 ± 0,2 ^{b*}	214 ± 5 ^{a***}	1,67 10 ⁻⁶ ± 0,05 10 ⁻⁶ ^{a*}

^a Diferença significativa em relação a G0, **a***** (p < 0,0001), **a**** (p < 0,01) e **a*** (p < 0,05)

^b Diferença significativa entre G1 e G2, **b***** (p < 0,0001), **b**** (p < 0,01) e **b*** (p < 0,05)

A análise estatística foi realizada através do teste “*one-way analysis of variance*” (ANOVA) e o *Tukey’s post-hoc* (GraphPad Prism 5.03; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Na Tabela 4.2, todos os resultados são representados como a média ± erro padrão da média e os valores que possuem p < 0,05 são considerados significantes. Os gráficos a seguir permitem a observação dos dados da Tabela 4.2., de forma mais clara, onde o erro padrão dos parâmetros é expresso em forma de barras verticais.

O gráfico (Figura 4.15) que representa a porosidade do osso cortical (Por.Ct), com auxílio do pós teste de *Tukey’s post-hoc*, mostra que o índice Por.Ct obteve um aumento significativo em seu valor, na comparação dos grupos G0 e G1, assim como na comparação dos grupos G0 e G2. Não houve um aumento significativo deste parâmetro, quando comparados os dois grupos tratados G1 e G2.

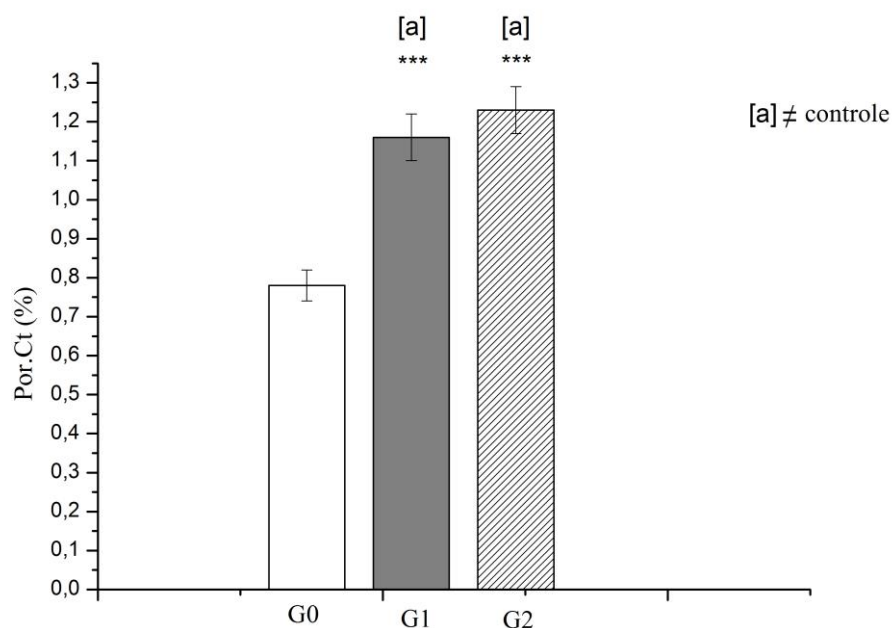


Figura 4.15: Gráfico dos valores de Por.Ct referente a diáfise do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a^{***} ($p < 0,0001$).

A razão entre o volume de poros e o volume total (Por.Ct) da amostra aumentou 48,71% ($p < 0,0001$) no grupo G1 em relação ao grupo G0, enquanto que o grupo G2 obteve um aumento de 57,69% ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle G0. Estas alterações microestruturais têm um impacto significativo sobre as propriedades mecânicas do osso cortical (YENI & NORMAN, 2000; McCALDEN *et al.*, 1993), já que o aumento da porosidade cortical no osso do fêmur está associado com maior risco de fratura (BELL *et al.*, 1999). O estudo desenvolvido por CHEN & KUBO (2014) também constatou-se que o aumento da porosidade cortical com o avanço da idade, é estritamente relacionado ao desenvolvimento da osteoporose.

De acordo com a análise dos resultados e do gráfico da Figura 4.16, o parâmetro Por.Th apresentou um aumento significativo de 4,94% ($p < 0,0001$) do grupo tratado G2 em relação ao grupo G0, assim como um aumento significativo de 2,69% ($p < 0,05$) do grupo G2 em relação ao grupo G1. O grupo G1 apresentou um aumento de 2,19%, na espessura dos poros, entretanto não foi significativo em relação ao grupo controle. Desta maneira, o grupo G2 apresentou um valor significativamente maior da espessura dos poros em comparação aos outros dois grupos. Conclui-se novamente, através do parâmetro Por.Th, que o regime AC afetou o osso de forma mais negativa que o regime TC em relação ao grupo controle, pois o aumento da espessura dos poros afeta

diretamente o gradiente da pressão do fluido sanguíneo (WANG *et al.*, 1999). Como o parâmetro Por.Th está diretamente correlacionado com a porosidade, pois esta é definida como a razão do volume de poros sobre volume cortical total, o aumento desta espessura acarreta uma maior fragilidade no osso. É possível observar que este parâmetro Por.Th apresenta um valor menor nas espécies que apresentam um menor valor da porosidade (grupo G1), assim como um valor significativamente maior para as espécies que apresentam um maior valor de porosidade (grupo G2).

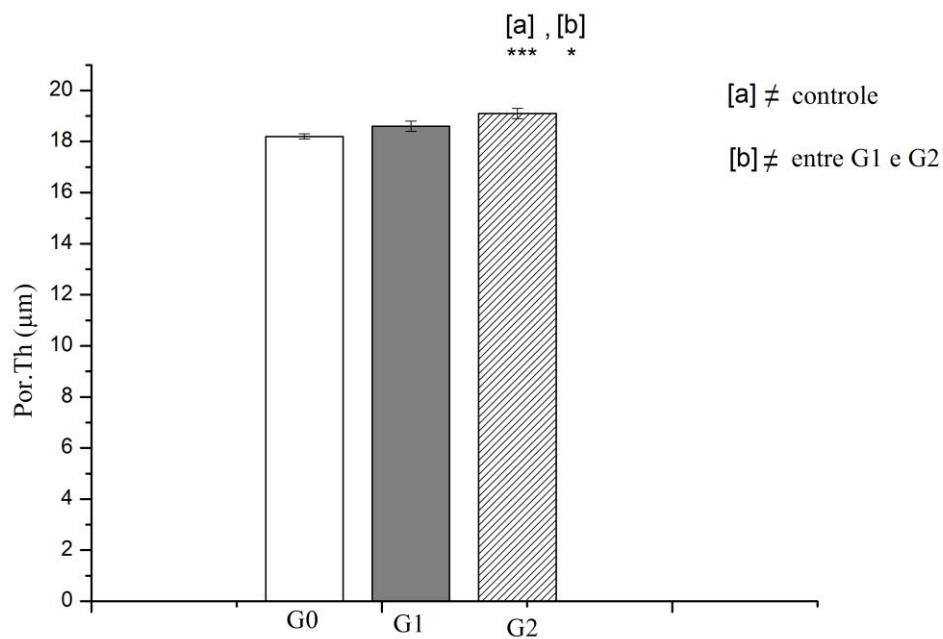


Figura 4.16: Gráfico dos valores de Por.Th referente a diáfise do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, **a***** ($p < 0,0001$), e diferença significativa entre G1 e G2, **b*** ($p < 0,05$).

A análise estatística juntamente com a análise do gráfico exibido na Figura 4.17 permite observar que o grupo G1 apresentou um aumento significativo de 21,37% ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, enquanto que o grupo G2 apresentou um aumento significativo de 15,17% ($p < 0,05$) em relação a G0, para o parâmetro Por.N. O parâmetro Por.Sp, separação média entre os poros (Figura 4.18), exibiu uma diminuição significativa de 14,64% ($p < 0,0001$) do grupo G1 em relação ao G0 assim como uma diminuição significativa de 10,46% ($p < 0,0001$) do grupo G2 em relação ao grupo G0. O grupo G1 apresentou o valor deste índice menor em relação ao grupo G2, indicando

que o espaçamento médio entre os poros, nas ratas tratadas com regime TC, foi menor que do grupo tratado com regime AC, entretanto não foi um valor significativo.

O índice Por.N (densidade de poros) está correlacionado diretamente com o parâmetro Por.Sp (separação média entre os poros), pois quanto maior o número de poros por volume, menor será o espaçamento entre os poros. Desta forma, como G1 apresentou o índice Por.N maior em relação ao grupo G0 do que o grupo G2 em relação ao G0, o índice Por.Sp, para este grupo G1 foi menor, em comparação com os outros dois grupos (Figuras 4.17 e 4.18).

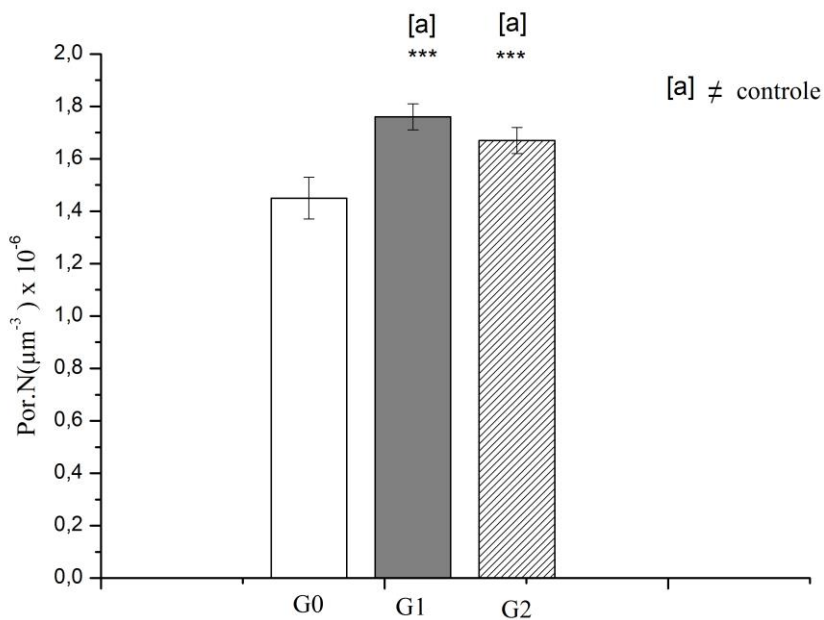


Figura 4.17: Gráfico dos valores de Por.N referente a diáfise do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a^{***} ($p < 0,0001$).

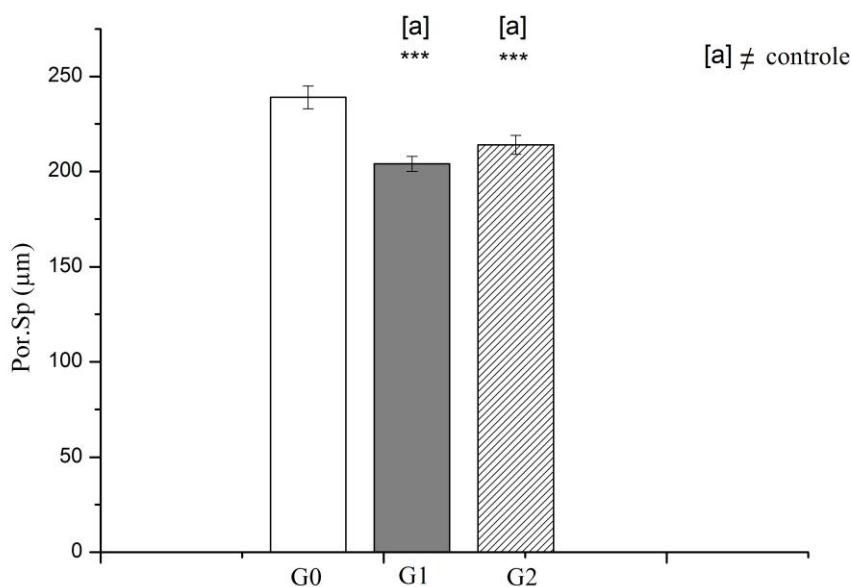


Figura 4.18: Gráfico dos valores de Por.Sp referente a diáfise do fêmur. Diferença significativa em relação a G0, a^{***} ($p < 0,0001$).

Os resultados deste trabalho referente à região cortical da diáfise do fêmur estão de acordo com LARRIERA *et al.* (2010), que analisou os efeitos ocasionados no osso cortical da tíbia de ratas ovariectomizadas (OVX), utilizando um microtomógrafo portátil. Em seu trabalho, LARRIERA *et al* calcularam a porosidade cortical, ou seja, razão entre o volume de poros e o volume total da amostra, e também a espessura média dos poros e verificaram que a porosidade cortical aumentou 32% no osso da tíbia, 6 semanas após a OVX, assim como diâmetro do canal aumentou nesta mesma região.

A μ TC vem se mostrando uma técnica eficiente para realizar a quantificação 3D, da região trabecular e do sistema de canais, do osso cortical de ratos. Estudos recentes afirmaram que apesar da DMO ser o parâmetro padrão para determinar a osteoporose, as alterações microestruturais do osso, fornecidas pelos parâmetros morfométricos, são determinantes essenciais para caracterizar a fragilidade óssea, independentemente da DMO (AUDRAN *et al.*, 2001; HORDON *et al.*, 2000; REEKER, 1993; LEGRAND *et al.*, 2000). Entretanto, esta técnica apresenta algumas limitações, por não fornecer informações sobre a dinâmica do osso. Não é possível distinguir entre reabsorção, formação óssea, assim como não é possível visualizar a orientação das fibras de colágeno e as lamelas concêntricas (MULLER *et al.*, 1998; UCHIYAMA *et al.*, 1997).

A resolução de 9 μm utilizada no sistema de detecção apresentou algumas limitações para este trabalho, pois os poros ou canais que possuísem um diâmetro menor que a largura do *pixel* da câmera, não foram captados. Contudo, como os diâmetros dos canais aumentam no osso, devido ao tratamento quimioterápico, resoluções não tão altas do sistema foram suficientes para adquirir dados confiáveis. E como o objetivo deste trabalho não foi estabelecer valores de referência para estes parâmetros corticais, mas sim comparar os valores obtidos destes parâmetros entre os três grupos analisados, este trabalho foi realizado com intento, pois foi possível realizar uma análise qualitativa minuciosa através das imagens adquiridas e uma análise quantitativa confiável através destes quatro parâmetros morfométricos referentes à região cortical do osso. Estes resultados foram publicados em (ALESSIO *et al.*, 2015).

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO

A análise da microarquitetura óssea é um elemento importante para avaliar as alterações ósseas promovidas pelo déficit do hormônio estrogênio no organismo. Este conhecimento é importante para a avaliação do risco de fraturas, assim como analisar a ação promovida pela droga no osso. A microtomografia computadorizada é uma técnica capaz de permitir investigações não destrutivas desta microarquitetura, quando realizada através da utilização da luz síncrotron, a qual permite a seleção de um feixe monocromático, fornece imagens tridimensionais de estruturas muito pequenas, da ordem de dezenas de micrômetros, permitindo uma análise minuciosa qualitativa e quantitativa das amostras, através da análise estatística dos parâmetros morfométricos entre os grupos. O feixe síncrotron fornece uma maior precisão aos parâmetros morfométricos, pois oferece imagens com uma maior definição e menos artefatos em relação às imagens obtidas por microtomógrafos portáteis, graças à alta coerência espacial.

Os resultados mostraram a capacidade da técnica de quantificação através dos parâmetros morfométricos por μ TC de revelar alterações nas microestruturas ósseas do grupo tratado G1 em relação ao grupo controle, da região trabecular da cabeça do fêmur, assim como dos grupos G0, G1e G2 com respeito à região cortical da diáfise do fêmur, da ordem de poucos micrômetros com bastante precisão, permitindo com poucas amostras um erro padrão aceitável. As imagens 2D e 3D obtidas através da técnica de μ TC associada a luz síncrotron também permitiram uma análise qualitativa coerente com os resultados obtidos através da quantificação morfométrica.

Estas alterações encontradas na microestrutura óssea das duas regiões analisadas neste trabalho sugerem que o mesmo processo de osteoporose causada pelo avanço da idade e pela diminuição da produção de estrogênio pode ocorrer com mulheres jovens tratadas com doxorubicina e ciclofosfamida assim como mulheres tratadas com docetaxel e ciclofosfamida. A análise dos parâmetros referentes à região trabecular da cabeça do fêmur entre o grupo controle e o grupo tratado G1 exibiu diferenças significativas. A mudança mais notável entre estes dois grupos ocorreu para os índices BV/TV e o SMI. O índice BV/TV obteve uma diminuição significativa para o grupo tratado G1, indicando que houve uma diminuição da massa óssea no grupo tratado com

o regime TC, tornando assim o osso mais frágil e com uma menor resistência mecânica. O parâmetro SMI também obteve um aumento significativo no grupo tratado G1, revelando assim uma diminuição na rigidez e na resistência mecânica do osso para este grupo. Apesar dos parâmetros Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N não terem apresentados diferenças significativas entre os dois grupos analisados (G0 e G1), o mesmo comportamento foi percebido por TROMP *et al.*, (2006) em relação aos índices morfométricos analisados em ratas que sofreram OVX, ou seja, que também sofreram alterações devido ao déficit de estrogênio.

A análise dos parâmetros morfométricos referentes às regiões corticais, em que foram investigados os sistemas de canais (poros) da região cortical da diáfise do fêmur entre o grupo controle e os grupos tratados G1 (regime TC) e G2 (regime AC), exibiu diferenças significativas com respeito a todos os parâmetros corticais em questão. O grupo tratado com regime AC apresentou um aumento da porosidade no osso cortical em relação ao grupo controle, ou seja, um desgaste maior na massa óssea, do que o grupo tratado com o regime TC em relação ao G0. Desta forma, os resultados obtidos indicam que o regime AC ocasiona um dano maior ao osso do fêmur do que o TC, para o mesmo tempo de tratamento. Estas alterações microestruturais têm um impacto significativo sobre as propriedades mecânicas do osso cortical (YENI & NORMAN, 2000; McCALDEN *et al.*, 1993), já que o aumento da porosidade cortical no osso do fêmur está associado diretamente com maior risco de fratura (BELL *et al.*, 1999), além de que o aumento da porosidade cortical com o avanço da idade, é estritamente relacionado ao desenvolvimento da osteoporose (CHEN & KUBO, 2014).

O parâmetro Por.Th apresentou também um aumento significativo do grupo G2 em relação ao grupo G0. Assim como um aumento significativo do grupo G2 em relação ao grupo G1, enquanto que o aumento da espessura média dos poros para o grupo G1, tratado com o regime TC não foi significativo perante o grupo controle. Desta forma, conclui-se novamente, através deste parâmetro, que o regime AC afetou o osso de forma mais negativa que o ciclo TC em relação ao grupo controle, pois o aumento da espessura dos poros afeta diretamente o gradiente da pressão do fluido sanguíneo, ou seja, a vazão sanguínea continuou a mesma, entretanto como a área da superfície dos canais aumentaram após o tratamento houve uma diminuição da velocidade sanguínea através dos poros (canais), o que prejudicou a circulação do sangue (WANG *et al.*, 1999).

O grupo G1 apresentou um aumento significativo do parâmetro Por.N em relação ao grupo controle, quando comparado ao aumento que o grupo G2 obteve para este parâmetro em relação ao grupo G0. Como a densidade de poros está diretamente correlacionada com o espaçamento médio entre eles, o grupo G1 apresentou um valor menor do parâmetro Por.Sp em relação ao grupo G0, do que o grupo G2. Entretanto, mesmo que o grupo tratado com o regime TC tenha apresentado uma densidade de poros maior que os outros grupos, é possível analisar através do parâmetro Por.Ct que no grupo tratado com o regime AC existiu uma perda maior de massa óssea em relação aos outros grupos, pois este parâmetro representa a razão do volume de poros sobre o volume total presente nas amostras. Desta maneira é possível salientar que realmente o regime AC ocasionou um maior dano ao sistema de canais do que o regime TC.

A análise e a compreensão dos efeitos colaterais imediatos nas microestruturas ósseas induzidos por estes tratamentos são fundamentais para um planejamento mais eficaz do tratamento do câncer, para que seja possível reduzir os riscos de fraturas decorrentes do tratamento, evitando assim que as pacientes alcancem um quadro osteoporótico. Desta forma a μ TC mostrou-se uma técnica eficiente para realizar a quantificação 3D, da região trabecular e do sistema de canais do osso cortical do rato, que os parâmetros morfométricos, calculados através desta técnica são determinantes essenciais para caracterizar a fragilidade óssea, independentemente da DMO (AUDRAN *et al.*, 2001; HORDON *et al.*, 2000; REEKER, 1993; LEGRAND *et al.*, 2000). Entretanto, esta técnica apresenta algumas limitações, por não fornecer informações sobre a dinâmica do osso, e por isso são necessários outros estudos que incluem biomarcadores de remodelação óssea para confirmar esta hipótese.

Desta forma, este trabalho sugere que o regime AC ocasionou alterações ósseas de forma mais negativa do que as alterações ósseas apresentadas pelo grupo tratado com o regime TC, apresentando um impacto significativo sobre as propriedades mecânicas do osso, associado com maior risco de fratura assim como está estritamente relacionado ao desenvolvimento da osteoporose.

5.1 Trabalhos Futuros

A osteoporose é uma doença caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, o que aumenta a fragilidade óssea e, portanto, a suscetibilidade a fraturas. A osteoporose é um importante problema de saúde pública, que leva a um maior risco de fraturas espontâneas e traumáticas. Atualmente, muitas terapias estão disponíveis para o tratamento da osteoporose, mas as existentes apresentam alguns problemas relacionados a eficácia e segurança a longo prazo. Dentre elas pode-se destacar o tratamento a base de cálcio e vitamina D, a base de bifosfonatos, calcitonina (agente antirreabsortivo), a utilização de moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), a terapia de reposição de estrogênio, a utilização de tibolona (hormônio esteróide sintético com propriedades estrogênicas), paratormônio (agente anabolizante).

O conhecimento dos efeitos adversos de medicamentos tem fundamental importância na escolha das drogas a serem empregadas também para a prevenção da osteoporose. Entretanto, nem sempre se tem o conhecimento total dos possíveis efeitos indesejáveis dos fármacos indicados para a prevenção de determinadas doenças. É evidente também a necessidade de melhorar as terapias existentes e de desenvolver novos agentes que sejam úteis tanto na prevenção quanto no tratamento da osteoporose no futuro.

Os bifosfonatos são potentes agentes de antireabsorção. Eles inibem a reabsorção óssea pelos osteoclastos, preservando o tecido ósseo, aumentando a massa óssea e reduzindo o risco de fraturas (BOUXSEINS *et al.*, 2003, BJARNASON *et al.*, 2008). No entanto, mais recentemente a Síndrome de Bronjs (necrose de mandíbula) tem sido referida por várias pesquisas europeias como a mais grave complicação do uso dos bifosfonatos, incluindo os mais potentes (ácido zolendronico, palmidronato de sódio, risedronatos, ibandronato), sendo que a ocorrência dessa síndrome não guarda relação com o tempo de uso. O aumento da incidência de necrose de mandíbula esta associado ao uso venoso, ou seja, ao ácido zolendronico. A osteonecrose de mandíbula (ONM) é uma reação adversa rara observada na administração de altas doses de bifosfonato endovenoso (SAMBROOK & EBELING, 2008). Entretanto, a relação existente ao uso de bifosfonatos em baixas doses e a necrose de mandíbula continua sem provas na literatura científica. Devido aos riscos da terapia estrogênica e da ausência de provas, os bifosfonatos orais continuam como primeira escolha para o tratamento de osteoporose pós-menopausa.

Desta forma, é de extrema importância o conhecimento dos efeitos adversos dos bifosfonatos no osso em um tratamento concomitante para o CM. Assim, como sugestão de trabalho futuro destaca-se a análise através da quantificação morfométrica nos ossos de ratas, tratadas com os mesmos regimes AC e TC, concomitantemente com diferentes doses de bifosfonatos, utilizando a técnica de μ TC. Esta análise na região trabecular e cortical é necessária tanto nos ossos longos como fêmur ou tíbia, como na mandíbula, para que seja possível analisar benefício ou danos, relacionado a diferentes doses deste agente no osso do fêmur e da mandíbula, em comparação a outro grupo de ratas também tratadas com os mesmos regimes quimioterápicos em conjunto com a reposição hormonal, para que seja possível observar o melhor tratamento aplicado na prevenção da osteoporose.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ADAMOWICZ, K., MARCZEWSKA, M., JASSEM, J., 2009, “Combining systemic therapies with radiation in breast cancer”, *Cancer Treatment Reviews*, v. 35, n. 5, pp. 409-16.
- ALESSIO, R., NOGUEIRA, L. P., ALMEIDA, A. P., COLAÇO, M. V., BRAZ, D., ANDRADE, C. B. V., SALATA, C., FERREIRA-MACHADO, S. C., DE ALMEIDA, C. E., TROMBA, G., BARROSO, R. C., 2014, “Synchrotron radiation X-ray microtomography and histomorphometry for evaluation of chemotherapy effects in trabecular bone structure”, *Journal of Physics: Conference Series*, v. 499, pp. 012-019.
- ALESSIO, R., NOGUEIRA, L. P., SALATA, C., MANTUANO, A., ALMEIDA, A. P., BRAZ, D., DE ALMEIDA, C. E., TROMBA, G., BARROSO, R. C., 2015, “Analysis of cortical bone porosity using synchrotron radiation microtomography to evaluate the Effects of chemotherapy”, *Radiation Physics and Chemistry*, doi:10.1016/j.radphyschem.2015.01.039.
- ALMEIDA, J. R. C., 2004, *Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade*. São Paulo, Editora Atheneu.
- AKHTER, M. P., LAPPE, J. M., DAVIES, K. M., REZCKER, R. R., 2007, “Transmenopausal Changes in the Trabecular Bone Structure”, *Bone*, v. 41, pp. 111-116.

- SILVA, A. P. R., *et al.*, 2011, Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil. CEDC, editor: INCA.
- ANDREUCCI, R., 2003, Apostila de Radiologia Industrial. Fonte: <http://www.infosolda.com.br/andreucci>.
- ARFELLI, F., 2000, “Synchrotron Light and Imaging Systems for Medical Radiology”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*, v. 454, pp. 11-25.
- ARNAL, J. F., VALERA, M. C., PAYRASTRE, B., LENFANT, F., GOURDY, P., 2012, “Structure-function relationship of estrogen receptors in cardiovascular pathophysiological models”, *Thromb Res.*, v. 130, pp. 7- 11.
- AUDRAN, M., CHAPPARD, D., LEGRAND, E., LIBOUBAN, H., BASLE', M. F., 2001, “Bone microarchitecture and bone fragility in men: DXA and histomorphometry in humans and in orchidectomized rat model”, *Calcified Tissue International*, v. 69, pp. 214–217.
- AVIOLI, L.V., KRANE, S., M., 1990, “Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders”, *Saunders Company, USA*.
- BARON, R., E., 1996, “*Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*”. 3ª ed. New York, Lippincott-Ravin Publishers.
- BELL, K.L., LOVERIDGE, N., POWER, J., GARRAHAN, N., MEGGITT, B.F., REEVE, J., 1999, “Regional differences in cortical porosity in the fractured femoral neck”, *Bone*, v. 24, pp. 57–64.
- BINES, J., EARL, H., BUZAID, A. C., SAAD E. D., 2014, “Anthracyclines and taxanes in the neo/adjuvant treatment of breast cancer: does the sequence matter?”, *Ann Oncol.*, v. 25, pp. 1079-1085.
- BJARNASON, N., H., HITZ, M., JORGENSEN, N., R., VESTERGAARD, P., 2008, “Adverse bone effects during pharmacological breast cancer therapy”, *Acta Oncologica*, v. 47, n. 4, pp. 747-754.
- BONASSA, E. M., 2005, *Enfermagem em terapêutica oncológica*. 3º ed. São Paulo, Atheneu.

- BOUGHEY, J., C., BUZDAR, A., U., HUNT, K., K., 2008, "Recent Advances in the Hormonal Treatment of Breast Cancer", *Current Problems in Surgery*, v. 45, n. 1, pp. 13-55.
- BOUXSEINS, L., 2003, "Bone Quality Where do We go From Here?", *Osteoporosis International*, v. 14, n. 5, pp. 118-127.
- BRINCKER, H., ROSE, C., RANK, F., MOURIDSEN, H.T., JAKOBSEN, A., DOMBERNOWSKY, P., PANDURO, J., ANDERSEN, K.W., 1987, "Evidence of a castration-mediated effect of adjuvant cytotoxic chemotherapy in premenopausal breast cancer", *J Clin Oncol*, v. 5, pp. 1771-1778.
- BUSSAB, W., O., & MORETTIN, P., A., "Estatística Básica", 4^a ed, Atual, São Paulo, 1987.
- CHEN, H., KUBO, K. Y., 2014, "Bone three-dimensional microstructural features of the common osteoporotic fracture sites", v. 5, pp. 486-495.
- CHIBBER, S., HASSAN, I., FARHAN, M., SALMAN, M., NASEEM, I., 2013, "White light augments chemotherapeutic potential of cyclophosphamide: an in vitro study", *Biometals*, v. 26, n. 1, pp. 23-31.
- CLARKE, B., L., KHOSLA, S., 2010, "Female reproductive system and bone", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 503, pp. 118-28.
- COOPER, D.M., TURINSKY, A.L., SENSEN, C.W., HALLGRIMSSON, B., 2003, "Quantitative 3D Analysis of the Canal Network in Cortical Bone by Micro-Computed Tomography", *The Anatomical Record New Anat.*, v. 274, pp. 169-179.
- COSAR, R., UZAL, C., TOKATLI, F., DENIZLI, B., SAYNAK, M., TURAN, N., et al., 2011, "Postmastectomy irradiation in breast in breast cancer patients with T1-2 and 1-3 positive axillary lymph nodes: is there a role for radiation therapy?", *Radiat Oncol.*, v. 6, pp. 1-8.
- DAVIES, J. H., EVANS, B. A., JENNEY, M. E., GREGORY, J. W., 2002, "In vitro effects of chemotherapeutic agents on human osteoblast-like cells", *Calcif Tissue Int.*, v. 70, pp. 408-415.

- DAYES, I., RUMBLE, R. B., BOWEN, J., DIXON, P., WARDE, P., 2012, “Intensity-modulated Radiotherapy in the Treatment of Breast Cancer”, *Clinical Oncology*, v. 24, n. 7, pp. 488-498.
- 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.
- DING, M., HVID, I., 2000, “Quantification of Age-Related Changes in the Structure Model Type and Trabecular Thickness of Human Tibial Cancellous Bone”, *Bone*, v. 26, pp. 291-295.
- DOUBE, M., KLOSOWSKI, M.M., ARGANDA-CARRERAS I., CORDELIERE F., DOUGHERTY, R.P., JACKSON J., 2010, “BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ”, *Bone*. v. 47 pp. 1076-1079.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE G.,2001,“Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomized trials”, *The Lancet*. v. 378, pp.771-784.
- EISBERG, R., RESNICK, R., 1994 “*Física Quântica*”, New York, John Wiley & Sons Inc.
- FALONI, A., P., S., CERRI, P., S., 2007, “Mecanismos celulares e moleculares do estrogênio na reabsorção óssea”, *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 36, n. 2, pp. 181-188.
- FDA US Food and Drug Administration. Guidance for industry. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, [www.fda.gov/downloads/Drugs/ Guidance Compliance RegulatoryInformation / Guidances/ucm078932.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance%20Compliance/RegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf): (2005, accessed 15June 2012)
- 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”, *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 4, pp. 3-11.

- FENG, X., 2011, "Disorders of bone remodeling", *Annu Rev Pathol.*, v. 6, pp. 121-45.
- FISHER, B., BAUER, M., MARGOLESE, R., POISSON, R., PILCH, Y., REDMOUND, C., et al., 1985, "Five-Year Results of a Randomized Clinical Trial Comparing Total Mastectomy and Segmental Mastectomy with or without Radiation in the Treatment of Breast Cancer", *New England Journal of Medicine*, v. 312, pp. 665-673.
- GILMAN, A. G., 2004, *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9 ed., Rio de Janeiro, McGraw-Hill Interamericana do Brasil.
- GONZALES, R. C., WOODS, R. E., 1992, *Digital Image Processing*. Addison-Wesley Publishing Company, Inc.
- GUISE, T.A., 2006, "Bone loss and fracture risk associated with cancer therapy", v.10, pp.1121-1131.
- HADJI, P., GNANT, M., BODY, J.J., BUNDRED, N.J., BRUFISKY, A., COLEMAN, R.E., GUISE, T.A., LIPTON, A., AAPRO, M.S., 2012, "Cancer treatment-induced bone loss in premenopausal women: A need for therapeutic intervention?", *Cancer Treatment Reviews*, v. 38, n. 6, pp. 798-806.
- 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.
- HENDERSON, I. C., 2011, "Can we abandon anthracyclines for early breast cancer patients?" *Oncology (Williston Park)*, v. 25, pp. 115-124.
- HERMANN, M., 2008, "The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: A comparative review" *Clinica Chimica Acta*, v. 393, pp. 57-75.
- HILDEDRAND, T., RUEGSEGGER, P., 1997a, "A New Method for the Model-independent Assessment of Thickness in Three-dimensional Images", *Journal of Microscopy*, v. 185, pp. 67- 75.
- HILDEDRAND, T., RUEGSEGGER, P., 1997b, "Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index", *Comput Meth Biomed Engng*, v.1, pp. 15-23.

- HOMMINGA, J., VAN-RIETBERGEN, B., LOCHMULLER, E.M., WEINANS, H., ECKSTEIN, F., HUISKESA, R., 2004, “The Osteoporotic Vertebral Structure is Well Adapted to the Loads of Daily Life, but not to Infrequent “error” Loads”, *Bone*, v. 34, pp. 510-516.
- HORDON, L. D., RAISI, M., ARON, J. E., PAXTON, S. K., BEETON, M., KANIS, J., A., 2000, “Trabecular architecture in women and men of similar bone mass with and without vertebral fracture: I. Two dimensional histology”, *Bone*, v. 27, pp. 271–276.
- 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, pp. 163-169.
- JAHNE, B., 2001, *Digital Image Processing*, 5th revised and extended edition, Spinger.
- JAHAN, Z., CASTELLI, S., AVERSA, G., RUFINI, S., DESIDERI, A., GIOVANETTI, A., 2013, “Role of human topoisomerase IB on ionizing radiation induced damage. *Biochem Bioph Res Co.*, v. 432, n. 3, pp. 545-548.
- JONES, S., HOLMES, F. A., O’SHAUGHNESSY, J., BLUM, J. L., VUKELJA, S. J., MCLNTYRE, K. J., PIPPEN, J. E., BORDELON, J. H., KIRBY, R. L., SANDBACH, J., HYMAN, W. J., RICHARDS, D. A., MENNEL, R. G., BOEHM, K. A., MEYER, W. G., ASMAR, L., MACKAY, D., RIEDEL, S., MUSS, H., SAVIN, M. A., 2009, “Docetaxel With Cyclophosphamide Is Associated With an Overall Survival Benefit Compared With Doxorubicin and Cyclophosphamide: 7-Year Follow-Up of US Oncology Research Trial 9735”, *J Clin Oncol.*, v. 27, pp. 1177-1183.
- KAK, A.C., SLANEY, M., 1987, *Principles of Computerized Tomographic Imaging*.
- KONDO, N., TAKAHASHI, A., ONO, K., OHNISHI, T., 2010, “DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways”, *J Nucleic Acids*, 543531.

- LAIB, A., BAROU, I.O., VICO, L., LAFAGE-PROUST, M.H., ALEXANDRE, C., RUEGSEGGER, P., 2000, “3D Micro-Computed Tomography of Trabecular and Cortical Bone Architecture with Application to a Rat Model of Immobilisation Osteoporosis”, *Med. Biol. Eng. Comput.*, v. 38, pp. 326-332.
- LANGLANDS, F. E., HORGAN, K., DODWELL, D. D., SMITH, L., 2013, “Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation”, *Br J Radiol.*, v. 86, pp. 20120601.
- LARRIERA, A. I., SHARMA, D., DOTY, S. B., CARDOSO, L., FRITTIN, S. P., 2010, “Using high resolution Micro-CT to assess vascular porosity changes in estrogen-depleted rat bone”, *Transactions of the 56th Meeting of the Orthopaedic Research Society*, v. 35, p. 598.
- LEGRAND, E., CHAPPARD, D., PASCARETTI, C., DUQUENNE, M., KREBS, S., ROHMER, V., BASLE, M. F., AUDRAN, M., 2000, “Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis”, *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 15, pp. 13–19.
- LORENSEN, W. E., CLINE H. E., 1987, “Marching Cubes: A High Resolution 3D Surface Construction Algorithm”, *Comput Graph (SIGGRAPH 87 Proceedings)*, v.21, pp. 163-169.
- PFEILSCHIFTER, J., DIEHL, I.J., 2000, “Osteoporosis Due to Cancer Treatment: Pathogenesis and Management”, *J Clin Oncol.*, 2000; v. 7, pp. 1570-1593.
- MAGALHÃES, M., N., & De LIMA, A., C., P., “*Noções de Probabilidade e Estatística*”, 3a ed, Editora USP, 2001.
- MALHOTRA, V., DORR, V. J., LYSS, A. P., ANDERSON, C. M., WESTGATE, S., REYNOLDS, M., BARRETT, B., PERRY, M. C., 2004, “Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy with Doxorubicin and Docetaxel in Locally Advanced Breast Cancer”, *Clinical Breast Cancer*, v. 5, pp. 377-384.
- MANOLAGAS, S., C., 2000, “Birth and Death of Bone Cells Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis”, *Endocrine Reviews*, v. 21, pp. 115-137.

- 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.
- McCALDEN, R. W., McGEOIGH, J. A., BARKER, M. B., COURT-BROWN, C. M., 1993, “Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure”, *J Bone Joint Surg Am.*, v.75, pp. 1193-1205.
- MEYER, P., L., “*Probabilidade: Aplicações à Estatística*”, 2^a ed, Editora Livros técnicos e Científicos,1983.
- MINISINI, A. M., MENIS, J., VALENT, F., ANDREETTA, C., ALESSI, B., PASCOLETTI, G., PIGA, A., FASOLA, G., PUGLISI, F., 2009, “Determinants of recovery from amenorrhea in premenopausal breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy in the taxane era”, *Anticancer Drugs*, v. 20, pp. 503-507.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - INCA. (2014, JANEIRO). ESTIMATIVA /2014 INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL. INCA: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=1>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2002 b). FALANDO SOBRE CÂNCER DE MAMA. Rio de Janeiro: Conprev.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, INCA, 2011, O que é o Câncer, www.inca.gov.br. Ministério da saúde-INCA. Instituto Nacional do Câncer. [Online] www.inca.gov.br/cancer.
- MONTANARI,F.,2003,[http://www.ts.infn.it/physics/experiments/syrma/SYRMEP/Tutorial tomo program.ppt](http://www.ts.infn.it/physics/experiments/syrma/SYRMEP/Tutorial%20tomo%20program.ppt)
- MONTEGOMERY, D., C., RUNGER, G., C., “*Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros*”, LTC. 5 ed., p. 548, 2012.
- MOSEKILDE, L., 1995, “Assessing Bone Quality- Animal Models in Preclinical Osteoporosis”, *Bone*, v. 17, pp. 343-352.
- MÜLLER, R., VAN CAMPENHOUT, H., VAN DAMME, B., VAN DER PERRE, G., DEQUEKER, J., HILDEBRAND, T., RUEGSEGGER, P., 1998, “Morphometric

Analysis of Human Bone Biopsies: A Quantitative Structural Comparison of Histological Section and Micro-computed Tomography”, *Bone*, v. 23, pp. 59-66.

MUÑOZ-TORRES, M., REYES-GARCÍA, R., MEZQUITA-RAYA, P., FERNÁNDEZ-GARCÍA, D., ALONSO, G., LUNA Jde, D., RUIZ-REQUENA, M. E., ESCOBAR-JIMÉNEZ, F., 2009, “Serum cathepsin K as a marker of bone metabolism in postmenopausal women treated with alendronate”, *Maturitas*, v. 64, n. 3, pp. 188-192.

MUNZONE, E., CURIGLIANO, G., BURSTEIN, H. J., WINER, E. P., GOLDHIRSCH, A., 2012, “CMF revisited in the 21st century”, *Ann Oncol.*, v. 23, n. 2, pp. 305-311.

MURAD, A. M., 2000, “Tratamento Sistêmico do câncer de mama”, *Revista Sociedade Brasileira de Cancerologia*, n. 9.

NETTER, F. H., 2004, “*Atlas de Anatomia Humana*”. 3^a ed, Porto Alegre, Artmed.

NG, A., BROCK, K. K., SHARPE, M. B., MOSELEY, J. L., CRAIG, T., HODGSON, D. C., 2012, “Individualized 3D Reconstruction of Normal Tissue Dose for Patients With Long-term Follow-up: A Step Toward Understanding Dose Risk for Late Toxicity”, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 84, n. 4, pp. 557-563.

NOGUEIRA, L., 2011, *Microtomografia Computadorizada e MicroFluorescência de Raios-X por Luz Síncrotron para Avaliação dos Efeitos da Radiação em Microestruturas ósseas de Ratos*. Tese de D.Sc., COOPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

NOGUEIRA, L. P., BRAZ, D., BARROSO, R. C., 2012, “Dependence of Threshold Variations on the Assessment of Histomorphometric Indices from Computed Microtomography Using Synchrotron Radiation”, *Micron*, v.43, pp. 739–745.

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.
- PACIFICI, R., 2012, “Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited”, *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 27, n. 2, pp. 231-239.
- PARKIN, M., FERNÁNDEZ, L., 2006, “Use of Statistics to Assess the Global Burden of Breast Cancer”, *Global Breast Cancer Statistics*, v. 12, pp. 70-80.
- PARIKKA, V., LEHENKARI, P., et al., 2001, “Estrogen Reduces the Depth of Resorption Pits by Disturbing the Organic Bone Matrix Degradation Activity of Mature Osteoclasts”, *Endocrinology*, v. 142, n.12, pp. 5371-5378.
- PEYMAN, H., Z., M.; MASKOW, C et al., 2009, “The influence of chemotherapy on bone mineral density, quantitative ultrasonometry and bone turnover in premenopausal women with breast cancer”, *Eur J Cancer*, v. 45, n. 3, pp. 205–212.
- PÉREZ-FIDALGO, J. A., ROSELLÓ, S., GARCÍA-GARRÉ, E., JORDÁ, E., MARTÍN-MARTORELL, P., BERMEJO, B., CHIRIVELLA, I., GUZMAN, C., LLUCH, A., 2010, “Incidence of chemotherapy induced amenorrhea in hormone-sensitive breast cancer patients: the impact of addition of taxanes to anthracyclin-based regimens”, *Breast Cancer Res Treat*, v. 120, pp. 245-251.
- PRATT, W.K., 2001. *Digital Image Processing*. 3^a Ed, Jonh Wiley e Sons, Inc.
- REAGAN-SHAW, S., NIHAL, M., AHMAD, N.,2008, “Dose translation from animal to human studies revisited”, *FASEB J.*, v. 22, pp.659-661.
- REEKER, R. R., 1993, “Architecture and vertebral fracture”, *Calcified Tissue International*, v. 53, pp. S139–S142.
- REYNO L. M., LEVINE, M. N., SKINGLEY, P., ARNOULD, A., ABU ZAHRA, H., 1992, “Chemotherapy induced amenorrhoea in a randomised trial of adjuvant chemotherapy duration in breast cancer”, *Eur J Cancer*, v. 29, pp. 21-23.
- RIDDLER, T.W., CALVARD, S., 1978, “Picture thresholding using an iterative selection method”, *IEEE Trans. System, Man and Cybernetics*, v. 8, pp. 630-632.
- ROCHÉ, H., FUMOLEAU, P., SPIELMANN, M., CANON, J., DELOZIER, T., SERIN, D., SYMANN, M., KERBRAT, P., SOULIÉ, P., EICHLER, F., VIENS, P., MONNIER, A., VINDEVOGHEL, A., CAMPONE, M., GOUDIER, M.,

- BONNETERRE, J., FERRERO, J., MARTIN, A., GENÈVE, J., ASSELAIN, B., 2006, “Sequential adjuvante epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial”, *Journal of Clinical Oncology*, v.24, pp. 5664-5671.
- ROTI ROTI, E.C., SALIH S.M., 2012, “Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced injury in mouse ovarian cells”, *Biol Reprod.*, v.86, pp. 1-11.
- SALATA, C., 2013, *Efeito da Radiação Ionizante e Quimioterápicos no Coração de Ratos Wistar*. Tese de D.Sc., UERJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SAMBROOK P. N., EBELING P., 2008, “Osteonecrosis of the jaw”. *Curr Rheumatol Rep*, v. 10, pp. 97-101.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S., ELICEIRI, K. W., 2012, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis”, *Nat. Meth.*,v.9, pp. 671-675.
- SHAPIRO, C.L., 2010, “Estrogen deficiency and bone loss in women with breast cancer”, *Breast Cancer Res Treat.*, v. 123. pp. 815-818.
- SHURYAK, I., BRENNER, D. J., 2009, “A model of interactions between radiation-induced oxidative stress, protein and DNA damage in *Deinococcus radiodurans*”, *J Theor Biol.*, v. 261, n. 2, pp. 305-317.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., JEMAL, A., 2013, “Cancer statistics, 2013”, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 63, pp. 11-30.
- TANK, E., BAKKER, A. D., KREGTING, S., CORNELISSEN, B., KLEIN-NULEND, J., VAN RIETBERGEN, B., 2009, “Predictive Value of Femoral Head Heterogeneity for Fracture Risk”, *Bone*, v.44, pp. 590-595.
- 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.
- TIEZZI, D. G., 2007, “Breast-conserving surgery for breast cancer”, *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v. 29, n. 8, pp. 428-434.

- TROMP, M., BRAVENBOER, N., TANK, E., OOSTLANDER, A., HOLZMANN, P. J., KOSTENSE, P.J., ROOS, J.C., BURGER, E.H., HUISKES, R., LIPS P., 2006, “Additional Weight Bearing during Exercise and Estrogen in the Rat: The Effect on Bone Mass, Turnover, and Structure”, *Calcif Tissue Int*, v. 79, pp. 404-415.
- TSANG, Y., HAVILAND, J., VENABLES, K., YARNOLD, J., 2012, “The impact of dose heterogeneity on late normal tissue complication risk after hypofractionated whole breast radiotherapy”, *Radiotherapy and Oncology*, v. 104, n. 2, pp. 143-147.
- 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.
- UCHIYANA, T., TANIZAWA, T., MURAMATSU, H., ENDO, N., TAKAHASHI, H. E., HARA, T., 1997, “A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry”, *Calcif Tissue Int*, v. 61, pp. 493-498.
- VAISHAMPAYAN, U., PARCHMENT, R. E., JASTI, B. R., HUSSAIN, M., 1999, “Taxanes: an overview of the pharmacokinetics and pharmacodynamics”, *Urology*, v. 54, pp. 22-29.
- VERA-BADILLO, F. E., NAPOLEONE, M., OCANA, A., TEMPLETON, A. J., SERUGA, B., AL-MUBARAK, M., ALHASHEM, H., TANNOCK, I. F., AMIR, E., 2014, “Effect of multifocality and multicentricity on outcome in early stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis”, *Breast Cancer Res Treat*; v.146, pp. 235-244
- VERONESI, U., SACCOZZI, R., DEL VECCHIO, M., BANFI, A., CLEMENTE, C., DE LENA, M., et al., 1981, “Comparing Radical Mastectomy with Quadrantectomy, Axillary Dissection, and Radiotherapy in Patients with Small Cancers of the Breast”, *New England Journal of Medicine*, v. 305, pp. 6-11.
- WANG, L., FRITTON, S. P., COWIN, S. C., WEINBAUM, S., 1999, “Fluid pressure relaxation depends upon osteonal microstructure: modeling an oscillatory bending experiment”, *J Biomech*, v. 32, pp. 663-672.

- WARD, J. F., 1990, "The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review", *Int J Radiat Biol.*, v. 57, n. 6, pp. 1141-1150.
- WHELAN, T., LEVINE, L., WILLAN, A., GAFINI, A., SANDERS, K., MIRSKY, D., CHAMBERS, S., O'BRIEN, M. A., REID, S., DUBOIS, S., 2004, "Effect of a Decision Aid on Knowledge and Treatment Decision Making for Breast Cancer Surgery. A Randomized Trial", *JAMA*, v. 292, n. 4, pp. 435-441.
- YENI, Y. N., NORMAN, T. L., 2000, "Fracture toughness of human femoral neck: effect of microstructure, composition, and age", *Bone*, v. 26, pp. 499-504.
- ZHOU, W. B., YIN, H., LIU, X. A., ZHA X. M., CHEN, L., DAI, J. C., TAO, A. D., CHEN, L., MA, J. J., LING, L. J., WANG, S., 2010, "Incidence of chemotherapy-induced amenorrhea associated with epirubicin, docetaxel and navelbine in younger breast cancer patients", *Bmc Cancer*, v. 10, pp. 1-6.